MEMÓRIAS
DO
INSTITUTO BUTANTAN

1946

TOMO XIX

São Paulo, Brasil
Caixa Postal 65

MEMÓRIAS

DO

INSTITUTO BUTANTAN

1946

TOMO XIX

São Paulo, Brasil
Caixa Postal 65

As "MEMORIAS DO INSTITUTO BUTANTAN" são destinadas à publicação de trabalhos realizados no Instituto ou com sua contribuição. Os trabalhos são dados à publicidade, separadamente, logo após a entrega e reunidos anualmente num volume.

Serão fornecidas, a pedido, separatas dos trabalhos publicados nas "Memorias", pedindo-se nesse caso o obsequio de enviar outras separatas, em permuta, para a Biblioteca do Instituto.

Toda a correspondencia editorial deve ser dirigida ao:

INSTITUTO BUTANTAN
Biblioteca
Caixa postal 65
S. Paulo — BRASIL

PEDE-SE PERMUTA
EXCHANGE DESIRED

ÍNDICE

QUILÓPODOS DO MUSEU PARANAENSE DE CURITIBA

POR WOLFGANG BUECHERL
(Do Laboratório de Ofiologia e Zoologia Médica, Instituto Butantan, S. Paulo, Brasil)

OTOSTIGMINAE Krpln., 1903

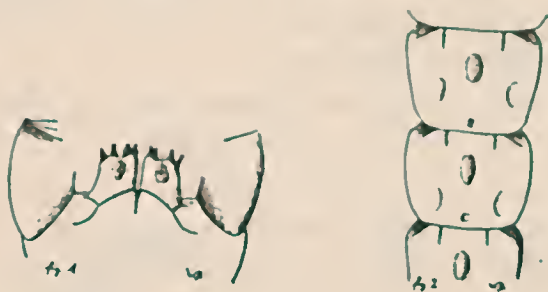
Genus *Otostigmus* Porat, 1876

Otostigmus inermis Por., 1876 — Uma fêmea jovem, capturada pelo sr. R. Hertel, em 1-7-45, em Volta Grande, Paraná.

Otostigmus limbatus Mein., 1886 — Um macho adulto, capturado pelo sr. R. B. Lange, em agôsto de 1944, em Curitiba, Paraná. Um segundo exemplar foi encontrado pelo mesmo sr. no mesmo local, um ano mais tarde e mais 1 em 1941.

Otostigmus pradoi Buecherl, 1939 — Dois exemplares, de Volta Grande, Paraná, capturados pelo sr. Hertel, em 10-10-44.

Otostigmus cavalcantei Buecherl, 1939 — Duas fêmeas adultas de Curitiba, Paraná, capturadas pelo sr. Lange, em 1945.

Otostigmus caudatus Broel., 1902 — Uma fêmea, colhida pelo sr. Lange, em Bariguí, Paraná, em novembro de 1944. O presente Otostigmíneo apresenta, como aliás quase todos os exemplares dos Estados do sul do Brasil, 2 sulcos paramedianos, muito curtos, anteriores e pouco nítidos nos esternitos, dos quais Broelemann escreve: "Esternitos sem sulcos".

Otostigmus langei sp. n. (Figs. 1 e 2).

Comprimento (sem antenas e últimas patas) — 47 a 53 mm;

Colorido — Placa cefálica, tergitos, 3 artículos basais das antenas e os dois últimos pares de patas roxo-oliváceo; tíbias, primeiros tarsos e as porções ter-

Recebido para publicação em 12 de setembro de 1945.

minais dos fêmures também roxo-oliváceo. Esternitos, prefêmures, porção proximal dos fêmures e segundos tarsos amarelo claro. Pêlos antenais amarelo doirados. Ou o roxo oliváceo dos tergitos e últimas patas dá lugar a um amarelo desmaiado e a um verde pálido nas partes distais dos fêmures, das tíbias e dos primeiros tarsos, permanecendo roxos apenas os artículos basais das antenas e a placa cefálica.

Antenas com 17 articulos moniliformes; os dois primeiros articulos basais totalmente desprovidos de pêlos; o terceiro só com pêlos na metade ventral distal; os outros articulos cobertos uniformemente de curtos pêlos loiros.

Coxosternum forcipular com placas dentárias munidas de 4 dentes de cada lado (Fig. 1), sendo os 2 internos um tanto afastados dos 2 externos; os 2 internos mais unidos do que os externos. No meio da cada placa 1 cerda robusta e longa, nascida numa depressão oval, grande. Sulco basal das placas dentárias curvo, continuando a curvatura no coxosternum. Com um curto sulco mediano, anterior. Sem outra depressão no coxosternum.

Sulcos paramedianos dos tergitos completos do oitavo ou nono até ao 19.° tergito, i. é, percorrendo todo o tergito; dos tergitos 2 a 7 ou 8 presentes apenas sob a forma de curtos sulcos anteriores e posteriores, mas apagados no meio das placas. 20.° tergito com sulcos paramedianos completos ou abrangendo apenas dois terços do comprimento da placa. Sómente o 21.° tergito com carenas laterais. Todos os tergitos glabros, brilhantes, sem quilias ou tuberculos.

Esternitos 2 a 19 ou 20 com 2 sulcos anteriores e 4 depressões (Fig. 2), sendo 2 medianas e 2 laterais. As últimas quase indistintas; as medianas bem nítidas, sendo a anterior oval e maior e a posterior redonda e menor. 21.° esternito com borda posterior ligeiramente procurva e com depressão longitudinal mediana em forma de leve fossa.

Patas 1 e 2 (raras vêzes 3) com 2 esporões tarsais; 3 (ou 4) a 19 (ou 18) com 1 esporão; 20 (ou 19) a 21 sem esporão tarsal.

1.° par de patas com 1 esporão no prefêmur e na tibia. Último tergito e últimas patas normais e iguais no macho e na fêmea.

Caracteres sexuais secundários, ausentes.

Tipo — Fêmea adulta, depositada na coleção quilopódica do Museu Paranaense, sob o No. 4.

Hab. — Volta Grande, Paraná.

Col. — R. Lange, em 1-7-45.

Paratipos — 2 exemplares, de Barigui, Paraná.

A espécie nova se aproxima de *O. tibialis* Broel. e de *O. pradoi* B., de maneira que, para a bôa distinção entre estas três espécies, convem atender ao seguinte esquema:

O. langei sp. n.	*O. tibialis*	*O. pradoi*
Placa cefálica e tergitos do mesmo colorido	Placa cefálica e 1.º tergito côr de castanha; tergitos verde oliváceos	Placa cefálica verde oliva; tergitos castanho ou vermelho escuros
Antenas 18 artículos	16-17, geralmente 17 artículos	17-18, geralmente 17 artículos
2 dentes internos parcialmente unidos	3 dentes internos parcialmente unidos	todos os dentes isolados
2-3 pares de patas com 2 esporões tarsais	só o 1.º par com 2 esporões tarsais	2-3 pares de patas com 2 esporões tarsais
4 cavidades nos esternitos	4 cavidades nos esternitos	só 2 cavidades medianas
47-53 mm comprimento	80 mm	40-45 mm

Otostigmus sternosulcatus sp. n. (Figs. 3 e 4).

Comprimento — 45-50 mm (sem antenas e últimas patas).

Colorido — roxo com nuances esverdeadas ou azuladas em todo o corpo, inclusive esternitos e patas. O tom violáceo é mais intenso nas antenas, placa cefálica e últimas patas.

Antenas com 18, às vêzes 19 artículos, munidos de pêlos curtos. Os dois primeiros artículos basais completamente sem pêlos, o terceiro artículo piloso já na metade distal, em tôda a volta.

Placas dentárias do coxosternum forcipular com 5 dentes em cada placa (Fig. 3), sendo os esternos de cada placa muito agudos e isolados. Os 3 internos, dos quais o mais interno é muito menor e nascido num plano inferior, são mais ou menos reunidos na base. Com uma certa em cada placa, nascida numa depressão quase redonda e relativamente pequena. Sulcos basais formando um ângulo de 170°, com 1 curto sulco mediano. Sulcos laterais do coxosternum terminando nos sulcos basais em ângulo aberto.

Tergitos glabros, sem quilias, tuberculos ou pseudocarenas. Com 2 sulcos paramedianos desde o 2.° até ao 20.° tergito, a saber do 2.° ao 5.° só 2 sulcos anteriores curtos, do 6.° ao 20.° completos, percorrendo tôda a extensão da placa. Sómente o 21.° tergito com carenas laterais.

Esternitos glabros, sem cavidades ou depressões. Desde o 2.° ao 18.° com 2 sulcos anteriores que atingem quase a metade da placa (Fig.4) e do 6.° (ou 8.°) ao 17.° além disso com 2 sulcos mais posteriores.

Patas 1-13 com 2 esporões tarsais; 14-20 com 1 esporão, 21 sem esporão tarsal.

1.° par de patas sem esporão no prefêmur, com 1 esporão no fêmur e 1 na tibia.

2.° par de patas apenas com 1 esporão na tíbia.

Tipo — Fêmea adulta, na coleção quilopódica do Museu Paranaense, sob o No. 16.

Hab. — Rio d'Areia, Paraná.

Col. — R. Lange, em setembro de 1944.

Paratipos — 2 exemplares, de Contenda, Paraná.

A nova espécie é afim de *O. kretzi* Buecherl e *O. dolosus* A., pelo que estabelecemos os seguintes confrontos morfológicos:

O. sternosulcatus	*O. kretzi*	*O. dolosus*
Todo o corpo roxo, verde ou azulado, inclusive esternitos e patas	Esternitos amarelos. Patas verdes e azuladas	Esternitos e extremidades amarelos
18-19 articulos antenais	17-18 articulos	17 articulos
5 dentes em cada placa dentária, mais ou menos isolados	5 dentes, mas unidos igualmente entre si	4 dentes somente
Esternitos com sulcos anteriores e posteriores	Somente sulcos anteriores	Sulcos anteriores só, porem mais longos do que em *kretzi*
Patas 1-13 com 2 esporões tarsais	2 esporões de 1-16	Só o 1.° e 2.° com 2 esporões tarsais

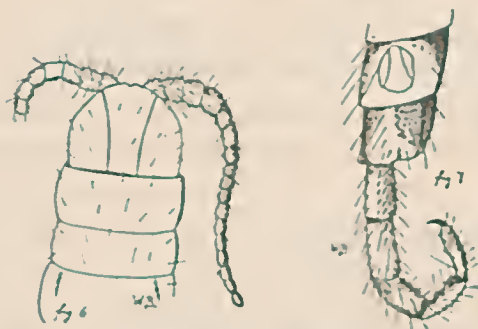
CRYPTOPIDAE Verhoeff 1906

Cryptopinae Att., 1930

Genus *Cryptops* Leach, 1815

Cryptops (Tr.) iheringi Broel. — 1 exemplar adulto, capturado por R. Lange, em abril de 1945, em Curitiba, Paraná. Um outro exemplar, capturado pelo mesmo sr., em 11-9-43, em Barigui, Paraná, apresenta as seguintes variações: serrilha de dentes no lado ventral da tíbia e do 2.° tarso das últimas patas em número de 15 na tíbia e de 4 no 1.° tarso (os do tarso bem maiores do que os da tíbia). Último par de patas sem cerdas longas, mas apenas com espinhos, muito numerosos e bastante regularmente dispostos em filas longitudinais.

Cryptops dubiotarsalis sp. n. (Figs. 6 e 7).

Comprimento — 21 a 23 mm (sem antenas e últimas patas).

Colorido — Placa cefálica e artículos antenais vermelho amarelados, com cerdas antenais amarelo-doiradas; esternitos, patas e último artículo antenal amarelo claro; tergitos amarelo escuro.

Coxosternum forcipular sem sulco longitudinal mediano.

Primeiro tergito cobrindo parte da placa cefálica (Fig. 6) e sem fossa semicircular.

Antenas (Fig. 6) com 17 artículos; 2 artículos basais sem pêlos, os outros artículos cobertos de pêlos curtos. Artículos basais cobertos de longas cerdas, muito numerosas. Estas cerdas decrescendo sensivelmente em número nos artículos seguintes.

Placa cefálica com 2 sulcos longitudinais, devergentes.

Tergitos lisos, sem tubérculos, mas com cerdas, mais numerosas nos últimos. Sulcos episcutais desde o 5.° até ao 20.° tergito; depressões paramedianas desde o 3.° ou 4.° até ao 19.° ao 20.° — 21.° tergito sòmente com carenas

laterais, mas sem tuberculos, porém com muitas cerdas irregularmente distribuidas (20 cerdas mais ou menos).

Esternitos lisos, sem rugas, com a cruz sulcal típica do 2.º ao 19.º, com cerdas apenas nos 4-5 últimos.

Campo poroso das coxopleutas quase sómente para a zona ventral i. é, atingindo sómente a metade das coxopleutas (Fig. 7) e ocupando nem a metade das mesmas. Póros bastante grandes, mas pouco numerosos (30-42 em cada campo). Entre os poros não existem cerdas. Êstes estão presentes na área não acupada pelos poros. Aí também existem alguns espinhos, curtos mas robustos.

Patas indistintamente biarticuladas, daí a escolha do nome desta espécie nova, cobertas de numerosas cerdas. Espinhos pequenos presentes apenas no lado ventral dos prefêmures e fêmures (não nas tíbias e nos tarsos) das patas anteriores (raras vêzes ausentes). Espinhos sempre presentes nos prefêmures e fêmures dos 2 últimos pares de patas, dispostos mais ou menos em filas longitudinais. Tíbia e 1.º tarso das últimas patas no lado ventral com dentes em forma de serrilha, a saber: 6-10 dentes na tíbia e 2-4 no 1.º tarso, sempre isolados (Fig. 7).

Tipo — macho adulto, na coleção quilopódica do Museu Paranaense, sob o No. 10.

Hab. — Volta Grande, Paraná.

Col. — R. Hertel, em 1-7-45.

Paratipos — 4 exemplares, sendo 1 macho e 2 fêmeas e 1 juvenil, de Barigui, Vila Velha, Curitiba e Guaraqueçuba respectivamente.

Afim de distinguir facilmente a *Cryptops* (*Cr.*) *dubiotarsalis* sp. n. das espécies afins, *Cr. heathii* Cham. (Brasil), *crassipes* Silv., *galatheae* Mein., (Argentina), damos a seguinte chave:

1 { Placa cefálica com 2 sulcos longitudinais, longos ou curtos 2
Placa cefálica sem sulcos longitudinais; 1.º tergito com fossa semicircular e 2 sulcos longitudinais .... *C. crassipes* (Argentina)

2 { Sulcos da placa cefálica muito curtos; só posteriores; 1.º tergito com fossa semicircular e 2 sulcos longitudinais formando um "W" .... *C. heathii* (Paraíba do Norte)
Sulcos da placa cefálica completos, divergentes 3

3 { Placa cefálica cobrindo uma parte do 1.º tergito; 1.º tergito com fossa semicircular .... *C. galatheae* (Montevideo, R. G. Sul)
1.º tergito cobrindo uma parte da placa cefálica; 1.º tergito sem fossa semicircular .... *C. dubiotarsalis* sp. n. (Paraná)

SCOLOPOCRYPTOPINAE Attems, 1914

Genus *Scolopocryptops* Newp., 1844

Scolopocryptops miersii miersii Newp. — 1 fêmea adulta, capturada pelo sr. R. Lange, em março de 1945, em Curitiba, Paraná.

Genus *Otocryptops* Haase, 1887

Otocryptops denticulatus sp. n. (Fig. 5).

Comprimento — 63-68 mm (sem antenas e patas).

Colorido — Castanho escuro nos tergitos e esternitos; placa céfálica e últimas patas avermelhadas; patas amareladas.

Placa cefálica — Esparsamente pontuada, sem sulcos.

Antenas — 17 artículos (às vezes só 16), pilosos, sem cerdas robustas nos artículos basais, mas apenas com cerdas comuns, muito esparsas, mais numerosas nos 3 artículos basais, que são desprovidos de pêlos.

Coxosternum forcipular — Com borda anterior quase reta, mas com placas dentárias nítidas (Fig. 5), ainda que muito pequenas, armadas de minúsculos dentes, parcialmente soldados (Fig. 5). Com um curto sulco mediano, muito leve, a desfazer-se numa rede sulcal horizontal, quase imperceptível.

Tergitos — Com sulcos longitudinais, paramedianos completos do 6.º ao 21.º tergito; do 3.º ao 5.º sòmente sulcos posteriores, curtos. Carenas laterais desde o 7.º ao 22.º tergito, bastante nítidos, mas muito abreviados, i. é, não atingindo a borda posterior da placa nos tergitos anteriores e posteriores. Atingem quase a borda posterior nos tergitos 18, 19 e 20-23º tergito sem carenas laterais.

Esternitos — Sem sulcos nem depressões. Poros muito salientes e bastante numerosos.

Patas — Com tarsos indivisos, mas com divisão articular em 1.º e 2.º tarso nas patas 22 e 23. 2 esporões tibiais nas patas 1 a 20; 1 esporão tibial

na 21.º extremidade; patas 22 e 23 sem esporão tibial; patas 1 a 21 com 1 esporão tarsal. Apêndice coxopleural muito agudo.

Campo poroso não atingindo completamente as bordas laterais do último tergito, demarcadas sob a forma de um sulco fino. Prefêmur último com 2 espinhos curvos, sendo o do lado superior muito menor do que o do lado ventral.

Tipo — Fêmea adulta, na coleção quilopódica do Museu Paranaense, sob o No. 7.

Hab. — Bariguí, Paraná.

Col. — R. Lange, em junho de 1943.

Paratipos — 1 macho, também de Barigui e mais uma fêmea, do mesmo local, o primeiro colecionado em 1943, a segunda em junho de 1945.

O. denticulatus se distingue de *O. ferrugineus ferrugineus* e de *O. melanostomus*, como segue:

denticulatus apresenta placas dentárias nitidas, com denticulos rudimentares, ausente umas e outros em *ferrugineus ferrugineus* e ausentes as primeiras em *melanostomus*, enquanto que os denticulos são presentes sob a forma de engrossamentos quitinosos.

No coxosternum forcipular de *O. denticulatus* há um curto sulco mediano, anterior, ausente em *f. ferrugineus* e *melanostomus*. Artículos basais das antenas de *denticulatus* sem as cerdas robustas e numerosas de *f. ferrugineus*, e *melanostomus*. Sulcos paramedianos dos tergitos completos em *melanostomus* desde o 3.º tergito; desde o 4.º ou 6.º em *f. ferrugineus*; desde o 3.º ao 5.º presentes sómente sob a forma de curtos sulcos posteriores, em *denticulatus*. Carenas laterais do 7.º ao 22.º em *denticulatus* e em *f. ferrugineus*, porém quase invisiveis ou muito leves no último, enquanto que no primeiro são bem nitidas. Em *melanostomus* as carenas laterais são ausentes nos 3 últimos tergitos. Sómente 18 partes da patas de *melanostomus* com 2 esporões tibiais; 19 pares de *f. ferrugineus*. 20 pares de patas em *denticulatus*. Último prefêmur de *f. ferrugineus* com 1 espinho dorsal grande e um ventral menor; *denticulatus* com espinho ventral grande e dorsal menor.

Lithobiomorpha Pocock, 1902

5 exemplares, respectivamente de Curitiba e Volta Grande. É um material muito interessante, provavelmente novo. Mas como até hoje não se conhece litobiomorfos no Brasil e como, por outro lado, o material é muito restrito, não se poderá, por enquanto, proceder a uma bôa classificação.

Geophilomorpha Pocock, 1895

4 exemplares de Volta Grande e Vila Velha, Paraná, pertencentes ao genero *Adenoschendyla*. A especificação só poderá ser feita, quando recebermos os últimos trabalhos de Attems e Verhoeff.

RESUMO

O material quilopódico do Museu Paranaense, de Curitiba, é classificado, fazendo-se reparos à rescrição original de *O. caudatus* Broel. e *Cryptops iheringi* Broel. e as seguintes espécies são descritas como novas: *Otostigmus langei*, *Otostigmus sternosulcatus*, *Cryptops dubiotarsalis* e *Otocryptops denticulatus*.

ABSTRACT

The *Chilopoda* collection of the "Museu Paranaense", of Curitiba, Brazil, is classified, corrections being made of the original descriptions of *O. caudatus* Broel. and *Cryptops iheringi* Broel., and the following new species are described: *Otostigmus langei*, *Otostigmus sternosulcatus*, *Cryptops dubiotarsalis* and *Otocryptops denticulatus*.

SÔBRE A DETERMINAÇÃO DOS 17-CETOSTEROIDES NA URINA HUMANA (*)

POR OLGA BOHOMOLETZ HENRIQUES & S. BAETA HENRIQUES
(Do Laboratório de Endocrinologia, Instituto Butantan, S. Paulo, Brasil)

A determinação dos 17-cetosteroides na urina constitui um método de estudo da eliminação dos hormônios gonadais e corticais de elevada importância experimental e clínica. O assunto vem sendo amplamente analisado dada a reconhecida dificuldade e imprecisão dos tests biológicos até agora empregados para o estudo do metabolismo dos hormônios esteroides.

A determinação dos 17-cetosteroides urinários implica em hidrólise e extração da urina. Friedgood, Taylor e Wright (13), estudando a hidrólise e extração dos 17-cetosteroides, chegaram à conclusão de que a hidrólise e a extração independentes causam menor perda de 17-cetosteroides e demonstraram que pelo processo de Smith, Smith e Schiller (20) a extração é mais completa.

Os processos colorimétricos de determinação de 17-cetosteroides na urina, são pouco satisfatórios por não se ter conseguido ainda uma reação específica ou o afastamento total dos outros cromógenos. O processo de Zimmermann (27) baseado na reação corada dos 17-cetosteroides com o *m*-dinitrobenzeno, tem sido até agora o mais usado nas suas várias modificações. Callow, Callow e Emmens (4) aperfeiçoaram consideravelmente o processo de Zimmermann e aconselharam a desconfiar de resultados nos quais a relação das leituras nos filtros azul e verde fosse alta. Para afastar os cromógenos foram introduzidos processos tais como: uso do reagente T de Girard (cloreto de trimetilamonio-acethidrazida) (21), equação de correção no desenvolvimento da côr (10) e um novo método colorimétrico usando tricloreto de antimônio (18).

De acôrdo com Cahen e Salter (3) o emprêgo do reagente de Girard acarretaria a perda de 10 a 15% da fração cetônica.

Consultando a literatura nacional encontramos apenas um trabalho sôbre a excreção normal dos 17-cetosteroides (16). Neste as determinações foram

---

(*) Trabalho em parte subvencionado pelos drs. Alberto Alves Filho e Alcino R. Lima por intermédio dos Fundos Universitários de Pesquisas. Comunicado na Sociedade de Biologia de S. Paulo, sessão de 8 de outubro de 1945.

Recebido para publicação em 8 de outubro de 1945.

feitas somente em urinas de homens e em uma mistura de várias amostras, não se tendo idéia da zona de variação nem da exereção por 24 horas.

No presente trabalho apresentamos valores de excreção de 17-cetosteroides em adultos normais de ambos os sexos. Comparamos o processo de extração de Smith e colab. (20) com um processo por nós adotado para fracionamento pelo reativo T de Girard. Para verificar si de fato procéde a crítica de Cahen e Salter (3) estudamos também a fração cromógena, não cetônica, sob o ponto de vista de hidrólise das acethidrazonas resultantes da combinação dos 17-cetosteroides com o reagente de Girard.

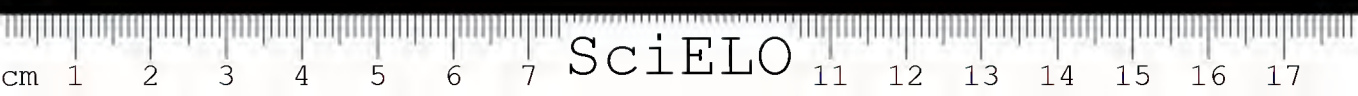
MATERIAL E MÉTODOS

A urina de 24 hs. foi colhida em frascos contendo 10 ml de ácido clorídrico C. P., d = 1.19, como preservativo. Os doadores de urina foram médicos, estudantes de medicina, enfermeiras e técnicos de laboratório, de 20 a 40 anos de idade. A todos era dada instrução por escrito sôbre a coleta da urina e no ato da entrega do material nos certificavamos da exatidão da coleta. As amostras foram guardadas na geladeira até imediatamente antes do exame, que era feito no prazo máximo de 30 dias. Fraser, Forbes, Albright e Sulkowi (10) verificaram que até depois de 3 meses não havia alteração da concentração dos 17-cetosteroides em urinas conservadas na geladeira com 1% de HCL d= 1.19. Em alguns casos repetimos a determinação com intervalo de 20 a 30 dias e obtivemos concordância dentro de 8%.

MÉTODOS

Hidrólise — A urina era colocada em balão de esmeril com condensador de refluxo, levada à ebulição, adicionada de ácido cloridrico, d = 1.19, de modo a elevar a concentração a 15% em volume, fervida por 10 minutos e resfriada imediatamente. Esta hidrólise foi usada tanto para a extração éter-tolueno como para extração etérea seguida de fracionamento pelo reagente de Girard.

A extração éter-tolueno foi feita pelo processo de Smith e colab. (20).

O fracionamento pelo reagente de Girard foi feito em extrato crú obtido da seguinte maneira: 250 ml de urina, imediatamente depois de hidrolisados, eram extraídos quatro vezes com 50 ml de éter etílico em funil separador de 500 ml. O extrato etéreo era lavado 4 vezes com 40 ml de hidróxido de sódio 10% e 3 vezes com 40 ml de água distilada. O éter era distilado e o resíduo aquoso sêco em dessecador, sôbre ácido sulfúrico concentrado. No extrato procedia-se ao fracionamento pelo Girard, de acôrdo com o método

descrito por Talbot, Butler, MacLachlan e Jones (22). Usando esta extração seguida de precipitação da fração cetônica, verificamos a recuperação de androsterona adicionada à urina hidrolisada. Esta recuperação variou de 88 a 94% o que concorda com os resultados de 85 a 95% obtidos por Talbot e colab. (22), comprovando assim a eficiência do método empregado.

A colorimetria foi feita pelo método de Zimmermann modificado por Callow e colab (4), com a diferença que diluiamos a mistura reagente, imediatamente antes da leitura com 20 ml de álcool etílico ao invés de 10 ml, para podermos fazer a determinação no eletro-fotômetro de Fisher. O resíduo da fração cetônica era dissolvido em 5 ml de alcool etílico e o da fração não cetônica em 1 ml. De ambos usava-se 0.2 ml para a colorimetria. Usamos o filtro verde que acompanha o eletrofotômetro e que tem a transparência máxima na

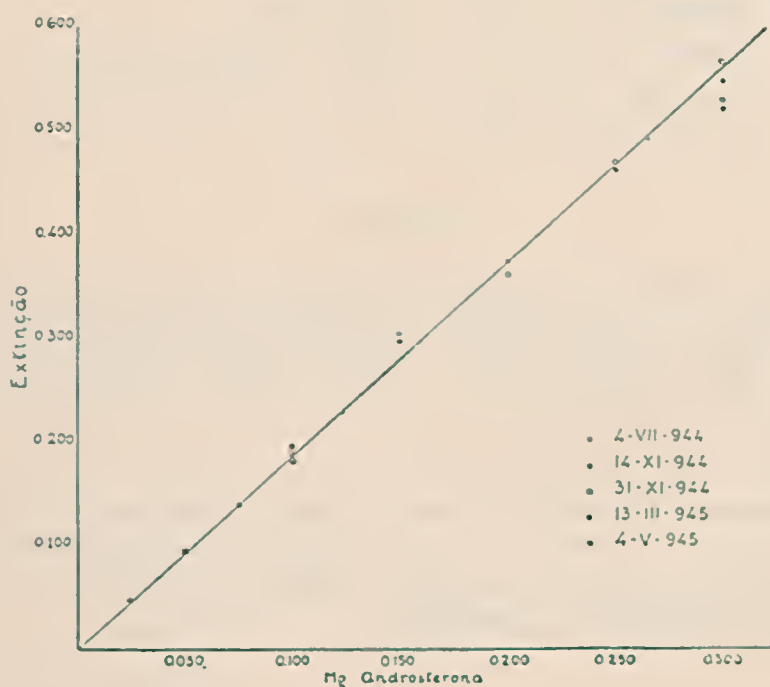



Fig. 1
17-KS na urina humana normal

zona entre 510 e 550 mμ. Determinamos vários pontos para a curva padrão, 5 vezes, em épocas diferentes, usando sempre solução nova de androsterona e reagentes novos (Figura 1). Tendo verificado que a reação segue a lei de Lambert-Beer, usamos sempre o k médio (1.86).

Reagentes — 1 — Alcool livre de aldeidos — Verificamos ser indispensável purificar o nosso alcool. Todas as amostras de alcool por nós examinadas, de diferentes proveniências, continham aldeidos em quantidade prejudicial á determinação dos 17-cetosteroides. Faziamos a purificação do alcool pelo método de Stout e Schuete, modificado por Tobie (23). A presença de aldeido era verificada pelo tempo de permanganato (1).

2 — *m*-dinitrobenzeno — Sintetizamos pelo processo descrito por Vanino (24), purificamos por recristalização até ponto de fusão 88.5°-89.5°C e repurificamos pelo processo de Wilgerodt (cit. *in* 4), obtendo um *m*-dinitrobenzeno de p.f. 90.5°-90.8°C. Para esta última purificação é indispensável usar alcool livre de aldeidos.

3 — Androsterona — Para as curvas de padronização usamos androsterona Schering-Kahlbaum. p. f. verificado: 181.5°-183.4°C. A atividade biológica da amostra foi comprovada em capões e pintos Leghorn.

4 — Reagente T de Girard — Usamos o de marca "Red Star".

5 — Éter etílico — Usamos éter Rhodia, isentado de peróxido pelo tratamento com sulfato ferroso (14).

RESULTADOS

Valores normais — Para 20 homens obtivemos variação entre 5.4 e 21.2 mg 17-cetosteroides por 24 hs (expressos em androsterona) com a média de 11.4 mg e desvio padrão de 3.88 (Tabela I). Para 19 mulheres obtivemos variação entre 4.2 a 11.7 mg por 24 hs, com a média de 7.6 mg e desvio padrão de 2.16 (Tabela II).

Comparação do método de extração de Smith e colab. com o fracionamento pelo reagente T de Girard — Em 12 determinações feitas obtivemos a mesma média pelos 2 processos, com as variações máximas de + 17% e — 9.5% relativamente à fração cetônica (Tabela III)

TABELA I

Excreção de 17-cetosteroides em 20 homens normais

Caso No.	Idade	Peso Kg	Altura cm	Mg "Androsterona"/ 24 h — Fração cetônica	Mg "Androsterona"/ 24 h — Fração não cetônica	N. CET. / CET. × 100
1	29	72	180	11.7	0.50	4.3
2	33	68	—	16.8	0.65	3.9
3	—	—	—	15.7	0.56	3.6
4	36	72	—	11.4	0.66	5.8
5	28	63	178	15.4	0.75	4.9
6	27	54	160	5.4	0.46	8.5
7	33	66	171	11.7	1.40	12.0
8	32	78	169	10.8	1.28	11.9
9	26	66	167	9.8	0.47	4.8
10	22	63	180	8.8	0.40	4.5
11	22	75	180	6.7	0.17	2.5
12	27	64	170	7.2	0.92	12.8
13	22	80	184	7.3	0.34	4.7
14	21	60	164	9.2	0.35	3.8
15	28	89	180	21.2	1.36	6.4
16	20	76	180	18.3	—	—
17	20	75	170	13.7	0.96	7.0
18	26	60	172	9.6	0.20	2.1
19	28	54	167	8.3	0.55	6.6
20	36	64	168	9.5	0.92	9.7
Médias		68.4	—	11.4	0.64	6.0

Fração não cetônica — A excreção média de 19 homens foi de 0.64 mg por 24 hs, com a variação de 0.17 a 1.40 e a de 19 mulheres foi de 0.31 com a zona de variação entre 0 e 0.53.

DISCUSSÃO

Valores normais — Os valores normais por nós encontrados são apresentados na Tabela IV em comparação com o valores normais encontrados por autores estrangeiros. Comparando os nossos valores com os dos 4 primeiros tra-

balhos citados na Tabela IV, vê-se que a nossa média de excreção parece ser mais baixa que a dos autores estrangeiros (17, 10, 19, 8). Êstes trabalhos foram feitos em condições semelhantes às nossas, tanto sob o ponto de vista da seleção de doadores de urina e do número de casos como sob o ponto de vista

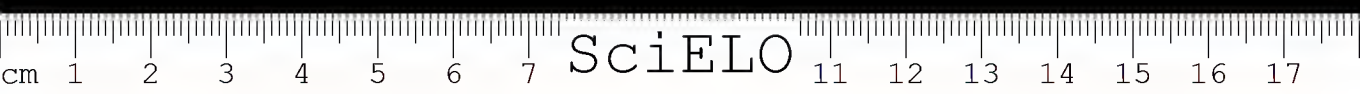



TABELA II

Excreção de 17-cetosteroides em 19 mulheres normais

Caso No.	Idade	Peso Kg	Altura cm	Dia do ciclo menstrual	Mg "Androsterona" 24 h — Fração cetônica	Mg "Androsterona" 24 h — Fração não cetônica	N. CET. / CET. × 100
21	—	—	—	—	8.5	0.12	1.4
22	21	53	156	7.°	7.2	0.37	5.1
23	21	46	152	—	4.9	0.28	5.7
24	25	67	156	4.°	10.0	0.37	3.7
25	23	56	157	11.°	11.1	0.53	4.8
26	22	53	154	6.°	12.7	0.43	3.4
27	23	49	158	20.°	6.3	0.15	2.4
28	23	53	155	20.°	4.7	0.45	9.6
29	21	50	158	25.°	4.2	0.02	0.5
30	20	63	159	24.°	9.7	0.42	4.3
31	37	56	157	25.°	6.6	0.00	0.00
32	21	67	167	4.°	8.7	0.16	1.8
33	36	52	155	23.°	5.1	0.16	3.1
34	30	64	160	15.°	6.3	0.38	6.0
35	20	54	163	27.°	8.3	0.39	4.7
36	22	54	164	12.°	6.1	0.53	8.7
37	22	51	158	26.°	5.9	0.26	4.4
38	21	55	161	18.°	7.8	0.50	6.4
39	29	60	167	11.°	10.0	0.45	4.5
Médias		56.3	—	16.4	7.6	0.31	4.2

da técnica de determinação. Friedgood e Whidden (12), Bauman e Metzger (2) e Werner (25) trabalharam com pequeno número de casos. Callow, Callow e Emmens (5) estudaram 10 homens e 11 mulheres, porém todos eram pacientes de hospital, ditos "sexualmente normais", apresentando, no entanto, afecções como: tireotoxicose, úlcera duodenal, melena, hematemese, etc. de modo que os seus resultados não têm significação como valores normais de excreção dos 17-cetosteroides. Drips e Osterberg (7) estudaram 17 homens e 26 mulheres, porém usaram o processo colorimétrico de Oesting, que foi severamente criticado por Friedgood e Whidden (11), de modo que os seus resultados são duvidosos.

Calculando a significância da diferença entre as médias por nós obtidas e as de Fraser, que mais se afastam das nossas, verifica-se que para os homens há uma diferença de 2,4 mg. com uma probabilidade de 10 a 20%, ao passo que para as mulheres, a diferença foi de 1,6 mg. com uma probabilidade de 5 - 10%.

Tabela III

Comparação dos resultados obtidos com o extrato crú eter-tolueno e com o extrato etéreo fracionado pelo reagente de Girard

Caso No.	Extrato crú eter-tolueno	Extrato etereo e reagente de Girard	Diferença	Diferença % relativa ao reag. Girard
	mg Androsterona	mg Androsterona		
1	10.9	11.7	— 0.8	— 6.8
2	16.6	16.8	— 0.2	— 1.2
5	15.0	15.4	— 0.4	— 2.6
6	5.2	5.4	— 0.2	— 3.7
7	13.5	11.7	+ 1.8	+ 15.4
18	11.3	9.6	+ 1.7	+ 17.7
20	9.6	9.5	+ 0.1	+ 1.0
8	10.7	10.8	— 0.1	— 0.93
26	11.6	12.7	— 0.9	— 7.1
27	6.2	6.3	— 0.1	— 1.6
28	4.6	4.7	— 0.1	— 2.1
29	3.8	4.2	— 0.4	— 9.5
Médias	9.9	9.9	—	—

Correlação entre excreção de 17-cetosteroides e pêso corporal de homens — Na literatura não encontramos nenhum estudo sôbre a correlação entre o pêso corporal e a excreção de 17-cetosteroides. Apenas Patterson e McPhee (17) observaram que indivíduos mais pesados apresentam maior excreção de 17-cetosteroides. Calculamos o índice de correlação entre o pêso corporal e a excreção. Isto foi fácil para o caso do homem normal, no qual a única variável que poderia influenciar a excreção seria o pêso corporal, pois Wooster (26) mostrou não haver correlação entre 17-cetosteroides excretados e o volume urinário. Verificamos que $r=0.702$, que, segundo a tabela de Fisher e Yates (9), indica ser inferior a 0.001 a probabilidade de não haver correlação. A Figura 2 apresenta o diagrama de dispersão das duas variáveis: 17-cetosteroides e pêso corporal.

TABELA IV

Excreção normal dos 17-cetosteroides urinários

Autores	HOMENS			MULHERES		
	"Androsterona" (mg/24 h)	Desvios padrões	Numero de casos	"Androsterona" (mg/24 h)	Desvios padrões	Numero de casos
Patterson & McPhee (17)	9.4 — 20.9 (13.3)	4.02[1]	9	3.5 — 14.6 (7.4)	2.97[1]	12
Fraser et al. (10)	8.1 — 22.6 (13.8)	4.45[1]	9	5.1 — 14.2 (9.0)	2.55[1]	14
Scott & Vermeulen (19)	11.6 — 17.5 (14.3)	—	10	5.6 — 15.5 (10.1)	—	5
Engstrom & Mason (16)	9.8 — 20.8 (14.2)	—	13	5.8 — 17.0 (10.2)	—	15
Henriques & Henriques[2] .	5.4 — 21.2 (11.4)	3.88	20	4.2 — 11.7 (7.6)	2.16	19
Callow & colab. (5) ...	3.5 — 15.0 (9.05)	2.416	10	1.7 — 12.6 (6.75)	3.268	11
Drips & Osterberg (7) ..	3.4 — 14.9 (9.3)	—	17	2.5 — 16.1 (7.4)	—	26
Friedgood & Whidden (12)	—	—	—	4.25 — 17.3 (9.50)	—	3
Bauman & Metzger[3] (2)	6.6 — 20.6 (14.5)	—	12	3.8 — 4.8 (4.5)	—	4
Werner (25)	10.0 — 17.3 (15.0)	—	2	6.9 — 12.2 (10.2)	—	1

[1] Desvios padrões calculados a partir dos dados dos autores.
[2] Presente trabalho.
[3] Resultados obtidos dos dados dos autores somando os α com os β-esteroides.

Correlação entre excreção de 17-cetosteroides e pêso corporal de mulheres — Para estas não foi possível tirar conclusão tão decisiva, porque, como se vê pela Tabela II, as mulheres estudadas estavam em várias fases do ciclo menstrual. Alguns autores (7, 15, 6) acharam alterações na excreção durante o ciclo menstrual, ao passo que outros (10, 17) verificaram não haver nenhuma relação. De qualquer maneira tivemos de jogar com 3 variáveis: pêso, ciclo e excreção.

Calculando o índice de correlação parcial entre pêso e excreção, encontramos $r_{12.3} = 0.317$ e o índice de correlação entre o ciclo e excreção $r_{13.2} = 0.423$. ($P > 0.1$ e $P > 0.05$ respectivamente). Concluimos que, com o nosso número de casos é duvidosa a correlação entre pêso e excreção e entre ciclo menstrual e excreção de 17-cetosteroides.

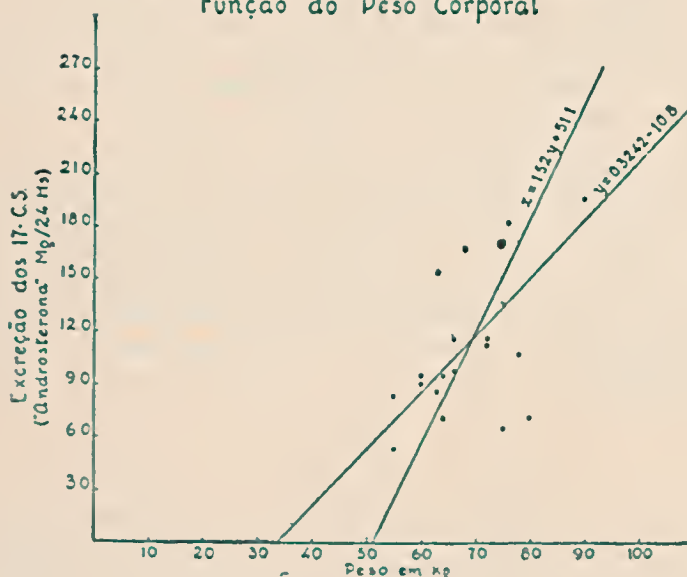



Fig. 2
17-KS na urina humana

Comparação das extrações — A comparação do método de Smith e colab. com o método de extração por nós usado para fracionamento pelo reativo de Girard, mostrou que a precisão dos dois processos é a mesma.

Perda por hidrólise na precipitação pelo reagente de Girard — A última coluna das Tabelas I e II apresenta a fração não cetônica em percentagem da fração cetônica. Vê-se que para as mulheres, em nenhum caso, a fração não cetônica alcançou 10% da fração cetônica. Para os homens, apenas em 3 casos, a fração não cetônica ultrapassou 10%, não chegando em nenhum caso a 15% da fração cetônica. Sendo a chamada fração não cetônica constituida por: a) cromógenos outros que não os 17-cetosteroides; b) pigmentos; c) 17-cetosteroides provenientes da hidrólise indevida das acethidrazonas, e não tendo a soma dêste 3 constituintes possíveis alcançado 10% da fração cetônica, podemos concluir seguramente que não há perda de 10 a 15% por hidrólise das acethidrazonas.

RESUMO

A determinação fotométrica dos 17-cetosteroides urinários, baseada na reação de Zimmermann, foi feita em 39 brasileiros, 20 homens e 19 mulheres, de 20 a 40 anos de idade, depois da extração da urina pelo éter, seguida de fracionamento do extrato com o reagente T de Girard. As médias dos valores normais e os respectivos desvios foram para os homens 11.4±3.88 e para as mulheres 7.6 ± 2.16 mg de "androsterona" nas 24 hs. Êstes valores não são significativamente inferiores àqueles registrados pelos autores estrangeiros. Foi observada uma correlação entre o pêso e a excreção dos 17-cetosteroides para os homens porém ela é duvidosa nos casos das mulheres. Também a correlação entre a excreção e o periodo do ciclo menstrual é duvidosa.

Em 12 casos foram comparados dois métodos de extração dos 17-cetosteroides, um pelo eter-tolueno e outro pelo éter seguido de fracionamento com o reagente de Girard. A média dos resultados em ambos os casos foi a mesma, mostrando assim que os dois métodos são igualmente precisos. Esta concordância e, sobretudo, o valor médio de 5.1% da fração não cetônica em relação à fração cetônica, não corroboram a crítica de alguns autores ao emprêgo do reagente de Girard.

ABSTRACT

Normal urinary excretion of 17-ketosteroids in Brazilians, 20 males and 19 females, 20 to 40 years old, was photocolorimetrically determined following Zimmermann's reaction. Ethereal extracts of samples from 24 hours urine were fractionated using Girard T reagent and the results expressed in mg of "androsterone". The average and its standard deviation according to the sex were respectivelly 11.4 ± 3.88 mg for men and 7.6 ± 2.16 mg for women. This values are not statistically different from those given by foreign authors.

Only in men a correlation was observed between 24 hours excretion of 17-ketosteroids and body weight. It seems also that the urinary excretion of those hormonal metabolites is unaffected by menstrual cycle.

In 12 cases the ether toluene extraction of Smith and Smith was performed comparatively with ether extraction followed by fractionation with Girard reagent; both methods were found equally accurate.

In our experiments there was no appreciable loss by hydrolyses during the fractionation of the ethereal extract by means of Girard T reagent, as claimed by others

(Agradecemos à Laborterápica S. A. as facilidades concedidas para a realização do presente trabalho).

BIBLIOGRAFIA

1. *Allen, A. H.* Allen's commercial organic analysis. Ed. 5. Philadelphia, Blakiston's Son and Co., 1923, vol. 1.
2. *Bauman, E. J. & Metzger, N.* Colorimetric estimation and fractionation of urinary androgens, *Endocrinol.*, 27:664-669, 1940.
3. *Cohen, R. L. & Salter, W. F.* Urinary 17-ketosteroids in metabolism. I — Standardized chemical estimation. *J. Biol. Chem.*, 152:489-499, 1944.
4. *Callow, N. H.; Callow, R. K. & Emmens, C. W.* Colorimetric determination of substances containing the grouping — CH^2CO — in urine extracts as an indication of androgen content, *Biochem. J.*, 32:1312-1331, 1938.
5. *Callow, N. H.; Callow, R. K. & Emmens, C. W.* Methods of extracting compounds related to the steroid hormones from human urine, *J. Endocrinol.*, 1:76-98, 1939.
6. *Dingemanse, E.; Borchardt, H. & Lacqueur, E.* Capon comb growth promoting substances "male hormones" in human urine of males and females of varying ages, *Biochem. J.*, 31:500-507, 1937.
7. *Drips, D. G. & Osterberg, A. E.* An evaluation of a colorimetric and a biologic method for determining urinary androgens, *Endocrinol.*, 27:345-354, 1940.
8. *Engstrom, W. W. & Moson, H. L.* The excretion of 17-ketosteroids in patients with hyperthyroidism and myxedema, *J. Clin. Endocrinol.*, 4:517-527, 1944.
9. *Fisher, R. A. & Yates, F.* Statistical Tables for Biological, Agricultural and Medical Research, ed. 2, London, Oliver and Boyd Ltd., 1943.
10. *Fraser, R. W.; Forbes, A. P.; Albright, F. & Sulkowi, H.* Colorimetric assay of 17-ketosteroids in urine, *J. Clin. Endocrinol.*, 1:234-256, 1941.
11. *Friedgood, H. B. & Whidden, H.* A spectrophotometric study of Oesting colorimeter and of the colors developed with crystalline androsterone and urinary ketosteroids by the Oesting modification of Zimmermann reaction, *Endocrinol.*, 27:242-248, 1940.
12. *Friedgood, H. B. & Whidden, H.* Colorimetric determination of crystalline and urinary ketosteroids, *Endocrinol.*, 27:258-267, 1940.
13. *Friedgood, H. B.; Taylor, E. H. & Wright, M. L.* Combined versus independent hydrolysis and extraction of urinary 17-ketosteroids, *J. Clin. Endocrinol.*, 3:638-647, 1943.
14. *Gatterman, L. & Wieland, H.* Laboratory methods of organic chemistry. London, MacMillan Co., 1943.
15. *Homblen, E. C.; Cuyler, W. K. & Baptist, M.* Urine androgens and uterine bleeding, *Endocrinol.*, 27:16-18, 1940.
16. *Lacaz de Moraes, J.* Considerações sobre a excreção urinaria de substâncias androgenicas em alguns casos clinicos, *An. Fac. Med. Univ. S. Paulo*, 17:687-713, 1941.
17. *Patterson, J. & McPhee, J.* 17-ketosteroids excretion in adrenal virilism, *Brit. Med. J.*, 1:35-39, 1942.
18. *Pincus, A.* New color reaction for certain urinary 17-ketosteroids, *Endocrinol.*, 32:176-184, 1943.

19. *Scott, W. W. & Vermeulen, C.* Studies on prostatic cancer. V. Excretion of 17-ketosteroids, estrogens and gonadotropins before and after castration, *J. Clin. Endocrinol.*, 2:450-456, 1942.

20. *Smith, O. W.; Smith, G. S. & Schiller, S.* The estrogens of urine from women. hydrolysis, separation and fractionation, *Endocrinol.*, 25:509-519, 1939.

21. *Talbot, N. B.; Butler, A. M. & MacLachlan, E.* The colorimetric assay of total, α—, and β -17-ketosteroids in extracts of human urine, *J. Biol. Chem.*, 132:595-603, 1940.

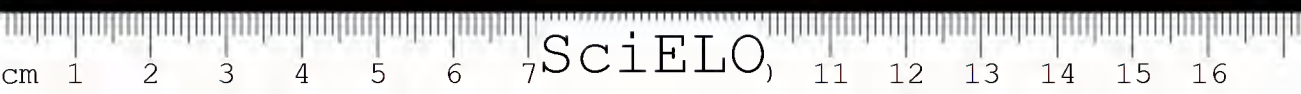
22. *Talbot, N. B.; Butler, A. M.; MacLachlan, E. & Jones, R. H.* Definition and elimination of certain errors in the hydrolysis, extraction and spectrochemical assay of α and β neutral urinary 17-ketosteroids, *J. Biol. Chem.*, 136:365-377, 1940.

23. *Tobie, W. C.* Improved procedures in determination of aldehydes in distilled alcoholic liquors with Schiff's reagent, *Food Research*, 3:499-504, 1938.

24. *Vanino, L.* Handbuch der Präparativen Chemie. Stuttgart, Ferdinand Enke, 1937, vol. 2.

25. *Werner, S. C.* The daily variation in the 17-ketosteroids excretion of men and women, *J. Clin. Endocrinol.*, 1:951-954, 1941.

26. *Wooster, H.* A biometric study of total neutral 17-ketosteroids excretion in the normal adult male, *J. Clin. Endocrinol.*, 3:483-492, 1943.

27. *Zimmermann, W.* Colorimetrische Bestimmung dre Keimdrüsen Hormone, *Zeitschr. f. Physiol. Chem.*, 245-7:47-57, 1937.

HEMOGLOBINA INATIVA (NÃO COMBINÁVEL AO OXIGÊNIO) NO SANGUE DO CÃO E DO HOMEM (*)

POR J. LEAL PRADO

(Do Laboratório de Endocrinologia, Instituto Butantan, S. Paulo, Brasil)

Reconhecidamente, a determinação precisa da hemoglobina (Hb) é medida de grande significação biológica.

Estudando a ação anemiante do benzoato de estradiol (9) tive a oportunidade de encontrar no sangue do cão uma fração de Hb não combinável ao oxigênio. A quantidade era suficientemente grande para tornar imprecisos os resultados obtidos pela capacidade fixadora de oxigênio. Anteriormente esta forma de Hb tinha sido encontrada na espécie humana, em quantidades variáveis intraindividualmente, por Ammundsen (1) que a denominou "Hb inativa". A principal finalidade do presente artigo é a de chamar a atenção para a existência desta forma de Hb. Tendo sido encontrada na espécie humana, nos ofídios (6), no cavalo (7) e, agora, nos cães, é bem provável que exista em outras espécies animais. Em vista dêstes achados a capacidade fixadora de oxigênio do sangue não pode mais ser considerada como método padrão para dosagem de Hb porque não determina a fração inativa cuja quantidade pode ser maior do que 20% da Hb total mesmo no homem.

Relato aqui a maneira pela qual se verificou a existência de Hb inativa em cães e também em onze casos humanos, apresentando os valores de Hb total e inativa encontrados em 22 cães normais e em 3 anêmicos.

MATERIAL E MÉTODOS

Empregaram-se 25 cães (Tab. I), adultos ou subadultos, de 3.6 a 10.8 kg. Havia 15 cães normais, (6 ♂, grupo A e 9 ♀, grupo D) e 10 animais castrados, (7 ♂ e 3 ♀) tratados ou não, com propionato de testosterona ou com benzoato de estradiol. Dos 10 animais castrados, 3 ficaram anêmicos (grupo F) em virtude do tratamento estrogênico. Os 7 restantes, que não ficaram

---

(*) Trabalho em parte subvencionado pelos drs. Alberto Alves Filho e Alcino R. Lima por intermédio dos Fundos Universitários de Pesquisas.

Recebido para publicação em outubro de 1945.

anêmicos, fazem com os 15 normais um grupo de 22 cães, aparentemente em boas condições de saúde, cujas taxas de Hb no sangue podem ser consideradas como normais.

TABELA I

Condições experimentais dos cães examinados

Grupos	Cão No.	Sexo	Peso kg	Condições
A	1	M	—	Normal. Sem tratamento
	2	M	7.1	Normal. Sem tratamento
	3	M	7.3	Normal. Sem tratamento
	4	M	6.8	Normal. Sem tratamento
	5	M	5.9	Normal. Sem tratamento
	6	M	6.6	Normal. Sem tratamento
B	7	M	8.2	Castrado. Sem tratamento
	8	M	6.2	Castrado. Sem tratamento
	9	M	6.3	Castrado. Sem tratamento
C	10	M	9.3	Castrado. Tratado com propionato de testosterona.
	11	M	6.6	Castrado. Tratado com propionato de testosterona.
D	12	F	10.8	Normal. Sem tratamento
	13	F	7.5	Normal. Sem tratamento
	14	F	7.0	Normal. Sem tratamento
	15	F	5.9	Normal. Sem tratamento
	16	F	10.1	Normal. Sem tratamento
	17	F	5.6	Normal. Sem tratamento
	18	F	4.5	Normal. Sem tratamento
	19	F	7.6	Normal. Sem tratamento
	20	F	10.5	Normal. Sem tratamento
E	21	F	3.6	Castrada. Tratada com propionato de testosterona
	22	F	4.4	Castrada. Tratada com propionato de testosterona
F	23	F	7.8	Castrada. Tratada com benzoato de estradiol. Anêmica
	24	M	5.4	Castrado. Tratado com benzoato de estradiol. Anêmico
	25	M	6.1	Castrado. Tratado com benzoato de estradiol. Anêmico

A alimentação consistiu de visceras de boi cosidas, polenta e verdura suplementada com mistura salina e óleo de fígado de peixe.

A colheita do sangue foi feita por punção da veia safena externa com o mínimo de estase possível; o sangue era oxalatado a 0.2 g %.

Empregaram-se os seguintes métodos para determinar a Hb.

1. Capacidade de fixação do oxigênio do sangue; método de Van Slyke & Stadie (10). Aproximadamente 3 ml de sangue eram aerados em funis separadores de 250 a 300 ml de capacidade durante 5 minutos no mínimo. A extração dos gazes era feita, durante 10 minutos, em um aparelho volumétrico de Van Slyke agitado a motor.

2. Determinação do ferro total do sangue. Foi usado o método de Ponder (1942) com uma pequena modificação introduzida anteriormente (6).

Todo o material volumétrico utilizado, inclusive a haste graduada do aparelho de Van Slyke, foi verificado préviamente.

EXPERIMENTAÇÃO

A verificação da existência de Hb inativa dependeu, em última análise, do fato já conhecido que 1 grama de ferro da Hb ordinária se combina a 400 ± 5 ml. de oxigênio. Determinando-se simultâneamente o ferro total e a capacidade fixadora de oxigênio na mesma amostra de sangue, fica fácil calcular a quantidade de oxigênio fixada por 1 grama de ferro. Si esta quantidade for menor do que 400 ml., será possivel calcular a porcentagem de Hb total que deixou de fixar oxigênio. A capacidade de oxigênio de um sangue que contenha, por exemplo, 50 mg % de ferro deverá ser de 20 ml de oxigênio, dêsde que toda sua Hb esteja ativa. Si a capacidade for menor do que 20, a diferença terá sido motivada pela existência de Hb inativa em percentagem assim determinável.

Baseado neste raciocinio, fiz determinações do ferro total e da capacidade fixadora de oxigênio nas mesmas amostras de sangue dos vinte e cinco cães. (Tab. II). Nas colunas 5 e 7 calculei a Hb a partir da concentração de ferro total no sangue e da capacidade de oxigênio, respectivamente. Usei como constantes para a Hb do cão os valores 0,338 mg % de ferro e 1.36 ml de oxigênio por grama de Hb, determinados por Morrison & Hisey (4). Na coluna 8 estão as quantidades de oxigênio que se combinaram a 1 g de ferro e na coluna 9 as porcentagens de Hb inativa, cansiderando 400 ± 5 ml de oxigênio por grama de ferro como 100% de Hb ativa.

Várias vezes, durante o trabalho, repetiam-se as dosagens na mesma amostra de sangue. As diferenças entre duas determinações da capacidade de oxigênio nunca foram maiores do que 0.5 volume % e as dosagens duplas de ferro no mesmo material diferiam no décimo de miligrama. Baseado nestes dados desprezei os valores de Hb inativa abaixo de 3.5%.

Dosei Hb inativa duas vezes. Na primeira série de determinações foi encontrada Hb inativa em 23 de 25 cães. Nos vinte e dois normais, o teor

TABELA II

Hemoglobina do sangue de cães. Determinações comparativas pelo Fe total (Ponder) e pela capacidade de O_2. Relações O_2/Fe (*). Porcentagens de Hb inativa.

Grupos	Cão No.	Data do exame	Fe mg %	Hb g % Ponder	Capacidade oxigênio	Hb g % Capacidade	Relação O_2/Fe	Hb inativa %
1	2	3	4	5	6	7	8	9
				MACHOS				
A.	1	24.X.44	44.6	13.2	16.1	11.9	361	9.8
	2	3.XI.44	59.3	17.6	21.3	15.7	359	10.2
	3	8.XI.44	61.7	18.3	21.6	15.9	350	12.5
	4	8.XI.44	49.5	14.6	19.1	14.0	386	3.5
	5	8.XI.44	48.8	14.4	19.1	14.0	391	2.2
	6	9.XI.44	57.5	17.0	22.2	16.3	386	3.5
B.	7	24.X.44	61.3	18.2	21.1	15.5	344	14.0
	8	24.X.44	55.6	16.4	20.0	14.7	360	10.0
	9	24.X.44	61.7	18.3	19.8	14.6	321	19.8
C	10	24.X.44	55.6	16.4	20.0	14.7	360	10.0
	11	24.X.44	57.5	17.0	20.6	15.2	358	10.5
				FÊMEAS				
D.	12	3.XI.44	65.6	19.4	23.4	17.2	357	10.8
	13	3.XI.44	51.9	15.4	19.7	14.5	380	5.0
	14	8.XI.44	5[illegible].8	15.0	18.4	13.5	362	9.5
	15	9.XI.44	64.5	19.1	22.6	16.6	350	12.5
	16	9.XI.44	64.9	19.2	24.7	18.2	381	4.8
	17	9.XI.44	57.2	16.9	20.1	14.8	351	12.2
	18	9.XI.44	49.8	14.7	17.1	12.6	343	14.2
	19	16.XI.44	63.3	18.7	23.4	17.2	370	7.5
	20	23.XI.44	68.7	20.3	26.8	19.7	390	2.5
E.	21	24.X.44	55.9	16.5	17.8	13.1	318	20.5
	22	24.X.44	55.6	16.4	18.2	13.4	327	18.2
				ANÊMICOS				
F.	23	24.X.44	41.5	12.3	13.8	10.2	333	16.8
	24	24.X.44	36.8	10.9	11.2	8.2	304	24.0
	25	24.X.44	42.0	12.4	12.3	9.0	293	26.8

(*) ml de O_2 combinados com 1 g de Fe.

mais baixo, o mais alto e a média, foram, respectivamente, 3.5, 20.5 e 11.7%. Depois de 8 a 30 dias as determinações foram repetidas em onze cães. (Tab. III). Em quatro animais (Nos. 6, 8, 10 e 11) não havia, agora, Hb inativa.

TABELA III

Hemoglobina do sangue de cães. Determinações comparativas pelo Ferro total (Ponder) e pela capacidade de oxigênio. Relações O_2/Fe. Porcentagens de Hb inativa.

Cão No.	Data do exame	Fe mg %	Hb g % Ponder	Capacidade oxigênio	Hb g % Capacidade	Relação O_2/Fe	Hb inativa %
3	16.XI.44	62.9	18.6	21.8	16.0	347	14.2
6	18.XI.44	56.6	16.8	23.2	17.1	410	0.0
8	28.XI.44	68.5	20.3	26.8	19.7	391	2.2
9	17.XI.44	[illegible]	19.5	24.4	17.9	360	10.0
10	[illegible]	55.6	16.5	21.9	16.1	394	1.5
11	21.XI.44	58.7	17.4	23.2	17.1	395	0.1
12	16.XI.44	68.0	20.1	24.2	17.8	356	[illegible]
14	16.XI.44	58.7	16.6	20.5	15.1	349	12.8
16	18.XI.44	70.7	20.9	26.5	19.5	375	6.2
23	23.XI.44	49.4	14.6	17.0	12.5	344	14.0
25	21.XI.44	49.4	17.6	14.0	10.3	283	24.2

Houve um aumento da porcentagem de Hb inativa em quatro cães (Nos. 3, 12, 14 e 16) e uma diminuição em sete (Nos. 6, 8, 9, 10, 11, 23 e 25). A média nesta segunda série de determinações, considerando somente os animais não anêmicos, foi de 10.8%.

TABELA IV

Presença e teor de Hemoglobina inativa no sangue humano normal.

Casos	Sexo	Idade	Fe mg %	Hb g % Ponder	Capacidade oxigênio	Hb g % Capacidade	Relação O_2/Fe	Hb inativa %
1. H. V. K.	M	26	58.3	17.2	22.4	16.5	384	4.0
2. L. P. C.	M	26	56.8	16.7	21.8	16.0	384	4.0
3. M. S.	M	21	59.0	17.4	22.6	16.6	383	4.2
4. B. S.	M	47	54.6	16.2	20.6	15.2	377	5.6
5. J. B. F.	M	26	54.5	16.0	20.6	15.2	378	5.5
6. H. R.	M	41	55.3	16.3	22.4	16.5	405	0.0
7. J. F.	M	48	54.0	15.9	21.9	16.1	405	0.0
8. L. M. P.	M	27	60.4	17.8	22.8	16.6	378	5.5
9. C. B.	M	33	54.0	16.0	21.9	16.1	406	0.0
10. N. P.	F	30	49.2	14.6	[illegible]	14.8	408	0.0
11. M. P.	F	29	50.2	14.8	19.5	14.3	[illegible]	3.0

Para controle das condições experimentais, foi seguido o mesmo processo em onze amostras de sangue humano normal (Tab. IV). Não havia Hb inativa

em cinco e foi encontrada uma quantidade de 4.0 a 5.6% nas seis restantes. A média foi de 4.8%. Para a Hb humana foram usadas as constantes determinadas por Bernhart & Skeggs (2).

DISCUSSÃO

Ammundsen (1) determinou a quantidade de Hb inativa em sangue humano normal baseando-se na diferença encontrada na capacidade de fixação do monóxido de carbono antes e depois de redução da Hb pelo hidrosulfito de sódio. Ela estudou oitenta e duas amostras de sangue, obtidas de cincoenta e tres individuos normais; foram encontrados de 2 a 12% de Hb inativa em 40% das amostras sanguineas. Foi observado tambem que a porcentagem de Hb inativa variava intraindividualmente, às vezes de maneira rápida; uma segunda determinação podia diferir da anterior de 5 a 10%.

Ramsay (7) determinou a quantidade de ferrihemoglobina (Hb inativa) em sangue de cavalo por processo gazométrico: a Hb ativa (ferrohemoglobina) era determinada pela capacidade de oxigênio e a "Hb total" pela capacidade de oxigênio depois de redução com solução fracamente alcalina de sal de titânio.

No presente trabalho usei um princípio diferente de determinação da quantidade de Hb inativa, mas acredito que os dados obtidos são comparáveis aos apresentados por Ammundsen e Ramsay.

No cão, como no homem, houve igual variação intraindividual na porcentagem de Hb não combinável ao oxigênio. A segunda série de determinações foi feita com a finalidade de permitir esta verificação e mostra as diferenças registradas em onze cães.

Num total de trinta e uma amostras de sangue obtidas de 22 cães normais, encontrei Hb inativa em vinte e cinco, isto é, em 82% das amostras e na quantidade média de 10.9% da Hb total. Parece, pois, que o sangue de cão contem Hb inativa em maior quantidade e mais frequentemente do que o sangue humano. Ramsay (7) estudou o sangue de dezessete cavalos e encontrou Hb inativa em quatorze, isto é, em 82% dos animais e na quantidade média de 8.4%, resultado bem parecido ao que encontrei para o cão. Cox & Wendel (3) trabalhando com método espetroscópico, negam a existência de metahemoglobina (Hb inativa) no sangue do cão normal mas Ramsay (7) não dá muito valor a êste achado negativo dada a pequena sensibilidade do método usado. O melhor estudo que encontrei na literatura sôbre a capacidade de fixação de monóxido de carbono da Hb de cão foi o de Morrison & Hisey (4). Êstes autores determinaram a capacidade de monoxido de carbono de 10 amostras de Hb recristalizada de cão e só registraram Hb inativa em duas. Ammundsen

(1), citando outros autores, diz que si as determinações eram feitas em sangue total o conteúdo de Hb, medido pela capacidade de oxigênio, era menor do que o obtido por outros métodos, mas que esta diferença não se registrava quando se usava Hb isolada pura. Por isto acredito que os resultados de Morrison & Hisey (4), com Hb recristalizada, não invalidam o achado do presente trabalho. Em dezessete amostras de Hb humana (preparadas lavando os glóbulos quatro a cinco vezes com solução fisiológica) aqueles autores não registraram também a existência de Hb inativa.

As dosagens de Hb não combinável ao oxigênio em sangue humano foram feitas para controle das condições experimentais porque a grande freqüência de Hb inativa em sangue de cão levantou a hipótese de um êrro sistemático. Dos onze casos estudados, seis continham 4.0 a 5.6% de Hb inativa e em cinco a Hb era totalmente combinável ao oxigênio. Em vista dos resultados, concluí pela validade das determinações feitas em cães.

Entre nós, Santos & Campos (8) já haviam observado uma grande discordância entre o método de Wong e a capacidade de oxigênio do sangue humano mas não a interpretaram como devida à Hb não combinável ao oxigênio. Ammundsen (1) foi quem chamou a atenção para a necessidade de serem abandonadas as capacidades de monoxido de carbono ou oxigênio como métodos precisos para a dosagem de Hb em sangue humano. Extendendo êste conselho aos ofidios, cavalos e cães quero, entretanto, insistir na existência de Hb inativa em sangue humano normal porque a desconsideração dêste fato poderá levar a erros grosseiros.

Talvez a verificação da presença de Hb inativa em sangue de cão, de cavalo e particularmente de ofídios (média de 17% de Hb inativa em 100% de 23 jararacas estudadas) possa servir como ponto de partida, quanto ao material experimental, para o esclarecimento da natureza química e significado fisiológico da Hb não combinável ao oxigênio.

Passando, agora, aos teores de Hb total encontrados para os cães, lembro e justifico a possibilidade de utilizá-los como valores normais.

Wintrobe, Shumacker & Schmidt (11) nada puderam concluir sôbre a existência ou não de uma diferença sexual no teor de Hb do sangue de cães. Uma possível explicação da diferença encontrada na espécie humana seria a menstruação. Nas espécies que não têm a perda mensal sanguínea, como o cão, seria de esperar-se uma igualdade na hemoglobinemia dos dois sexos. Baseando-me no exposto, suponho que além dos 15 cães normais (6 ♂ e 9 ♀) os animais dos grupos B, C e E, embora castrados ou tratados com o hormônio masculino, podem também ser considerados normais quanto à hemoglobinemia. Só ficam excluidos os tratados com benzoato de estradiol (grupo F) nitidamente

anêmicos. Neste grupo de 3 animais a média de Hb inativa em 5 amostras de sangue foi de 21.2%, praticamente duas vezes o valor médio encontrado para os cães normais. Até que ponto e de que forma o tratamento estrogênico interfére no teor de Hb inativa do cão, é questão para ser elucidada.

Todos os animais receberam tratamento antihelmíntico (9) e foram autopsiados no final das experiências. Não havia vermes no intestino ou a quantidade era seguramente insuficiente para anemizá-los.

RESUMO

A dosagem comparativa de Hb pelos métodos da capacidade fixadora de oxigênio e da determinação do ferro total (5), quando se empregam constantes já bem estabelecidas, permite calcular a porcentagem de Hb não combinável ao exigênio e chamada por Ammundsen (1) de Hb inativa. Num total de 31 amostras de sangue obtidas de 22 cães em boas condições de saúde e sem infestação helmíntica digna de registro, esta forma de Hb inativa foi encontrada em 82% das amostras e na quantidade média de 10.9% da Hb total. Em 3 cães anemiados pelo benzoato de estradiol a média de Hb inativa em 5 amostras de sangue foi de 21.2%.

Esta forma de Hb inativa foi procurada também em 11 amostras de sangue humano normal e encontrada em 6 delas, na média de 4.8%. Tanto no homem como no cão póde observar-se uma variação intraindividual no teor de Hb inativa quando se analisam amostras colhidas em datas diferentes.

A existência de Hb inativa em porcentagem apreciável no sangue do homem (1), do cavalo (7), dos ofídios (6) e agora do cão, sugére a sua procura em outras espécies e, o que é mais importante, a elucidação de seu significado fisiológico.

ABSTRACT

The percentage of non-oxygen-combining Hb ("inactive Hb." Ammundsen) (1) can be calculated from the respective values for the total Hb, measured by the van Slyke and Stadie's oxygen capacity method and the total blood iron content, determined after Ponder's method.

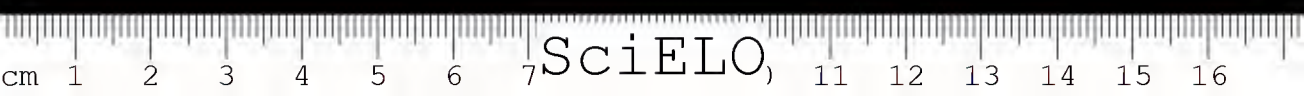
In 31 blood samples from 22 dogs, apparently in good health and without helminthic infestation, inactive hemoglobin was found in 82% of the blood samples, the mean value amounting to 10.9% of total Hb. In five blood samples obtained from 3 dogs, which had been anemized by estradiol benzoate, the average value of inactive Hemoglobin was 21.2%. In order to control the experimental

conditions inactive hemoglobin was also determined in the blood of 11 normal persons, presence of inactive Hb was found in 6 of these cases with a mean value of 4.8% of total Hb. There is an intraindividual variation of the inactive Hb content in the blood of dogs as well as of man.

The presence of inactive Hemoglobin in the blood of man (1).horse (7). Ophidia, (6) and now in dog suggests its search also in other species for a more exact study of this intricate problem.

BIBLIOGRAFIA

1. *Ammundsen, E.* Estudies on the presence of non-carbon-monoxide combining (inactive) hemoglobin in the blood of normal persons, *J. biol. Chem.*, **138**:563-570, 1941.
2. *Bernhart, F. W. & Skeggs, L.* The iron content of crystalline human hemoglobin, *J. biol. Chem.*, **147**:19-22, 1943.
3. *Cox, W. W. & Wendel, W. B.* The normal rate of reduction of methaemoglobin in dogs, *J. biol. Chem.*, **143**:331-340, 1942.
4. *Morrison, D. B. & Hisey, A.* The carbon monoxide capacity, iron and total nitrogen of dog hemoglobin, *J. biol. Chem.*, **109**:233-240, 1935.
5. *Ponder, E.* The relation between red blood cell density and corpuscular hemoglobin concentration, *J. biol. Chem.*, **144**:333-338, 1942.
6. *Prado, J. L.* Hemoglobina dos ofidios. Valores normais e presença de uma forma inativa no sangue da *Bothrops jararaca*, *Mem. Inst. Butantan*, **18**:55-66, 1944-45.
7. *Ramsay, W. N. M.* Ferrihaemoglobinaemia (Methaemoglobinaemia) in man and the horse, *Biochem. J.*, **38**:470-473, 1944.
8. *Santos, P. & Campos, M.* Estudo comparativo entre dois métodos indiretos de dosagem de hemoglobina, *São Paulo Medico*, **2**:449-454, 1931.
9. *Valle, J. R. & Prado, J. L.* A ser publicado.
10. *Van Slyke, D. D. & Stadie, W. C.* Citado em *Hawk, P. B. & Bergeim, O. Practical physiological chemistry*, 11.ª ed., 968 pp., Philadelphia, Blakiston, 1937.
11. *Wintrobe, M. M.; Shumacker, H. B. & Schmidt, W. J.* Values for number, size and hemoglobin content of erythrocytes in normal dogs, rabbits and rats, *Amer. J. Physiol.*, **114**:502-507, 1936.

Mem. Inst. Butantan,
19:33-40, 1946.

SÔBRE UM NOVO GÊNERO DE *LIOPHISTREMATINAE* ARTIGAS, RUIZ & LEÃO, 1942 (*TREMATODA, PLAGIORCHIIDAE*)

POR ARISTOTERIS T. LEÃO

(Do Laboratório de Parasitologia do Instituto Butantan, S. Paulo, Brasil)

No decorrer da necrópsia de um exemplar de *Liophis miliaris* (Linneu), recebido de Praia Grande — Santos — São Paulo, encontramos no pulmão do referido ofídeo 32 exemplares de um trematóide, cujo estudo é a razão do presente trabalho.

Supondo a princípio tratar-se de *Liophistrema pulmonalis* Artigas, Ruiz & Leão, 1942, procuramos estudar os helmintos ainda vivos afim de determinar o aparelho excretor dos mesmos. Posto que não tenhamos alcançado plenamente o nosso desiderato, foi-nos, no entanto, possível determinar com exatidão a forma e extensão da vesícula excretora.

Após a coloração e montagem dos helmintos verificamos, entretanto, estarmos de posse não do *Liophistrema pulmonalis* Artigas, Ruiz & Leão, 1942, mas sim de um trematóide que, pela posição da bolsa do cirro, vagina e poro genital, não póde ser enquadrado no gênero *Liophistrema*, sendo necessário erigir novo agrupamento genérico para contê-lo e que denominaremos

Bieria, gen. n.

Liophistrematinae — Bolsa do cirro pré-acetabular, entre a bifurcação cecal e o acetábulo. Poro genital lateral à linha mediana, na margem lateral do corpo, pré-acetabular. Ovário esferóide, post-acetabular, pré-testicular, liso. Testículos com zonas afastadas e compos coincidindo parcial ou totalmente, lisos. Receptáculo seminal, canal de Laurer e glândula de Mehlis presentes. Vitelinos de ácinos volumosos, em cachos, intra-cecais, cecais e extra-cecais.

Espécie tipo: *Bieria artigasi*, sp. n.

Bieria artigasi, sp n.

Trematóides muito grandes, com a extremidade anterior mais arredondada que a posterior que é afilada. Comprimento variando de 10 a 17mm. A maior

Entregue para publicação em 10 de fevereiro de 1946.

largura é observada ao nivel da zona acetabular que varia de 1,159 a 2,024mm. Cuticula revestida de espinhos, havendo maior intensidade dêstes na metade anterior do corpo, onde também atingem maior comprimento que aqueles situados na metade posterior. À medida que caminham em direção à região posterior do corpo dimnuem de intensidade e de tamanho até desaparecer por completo no 1/4 posterior do corpo. Ventosa oral subterminal, voltada para a face ventral, menor que o acetábulo, circular, medindo de 0,405 a 0,552mm de diâmetro longitudinal por 0,478 a 0,662mm de diâmetro transversal. Pré-faringe presente, medindo de 0,038 a 0,212mm de comprimento. Faringe musculoso, circundado por células de natureza glandular, medindo de 0,152 a 0,266mm de diâmetro longitudinal por 0,228 a 0,381mm de diâmetro transversal. Esofago curto, de comprimento variando entre 0,404 a 0,552mm. Acetábulo pré-equatorial, colocado mais ou menos no 1/6 anterior do corpo, medindo de 0,644 a 0,959mm de comprimento por 0,607 a 1,067 de largura. A distância entre as ventosas varia entre 1,067 a 1,564mm. Cecos simples, de trajeto mais ou menos retilíneo, de comprimento desigual, terminando de 3,467 a 5,888mm da extremidade posterior do corpo. Testículos situados mais ou menos na região equatorial do corpo, com campos coincidentes parcial ou totalmente e zonas afastadas, intra-cecais e cecais. Os testículos considerados em conjunto podem ser arredondados, ovalados ou piriformes, de superfície lisa. Considerados isoladamente o testículo anterior apresenta-se quase sempre como um esferóide e o posterior ovalado ou piriforme, apresentando ambos, portanto, conformação diversa num mesmo exemplar. Mede o testículo anterior de 0,625 a 0,920mm de diâmetro longitudinal por 0,368 a 0,681mm de diâmetro transversal. Testículo posterior medindo de 0,663 a 1,104mm de diâmetro longitudinal por 0,368 a 0,607mm de diâmetro transversal. Vasos eferentes muito longos, bem visíveis, unindo-se para formar o canal deferente único às vezes ao nivel da extremidade basal da bolsa do cirro e outras vezes em situação próxima do bordo posterior do acetábulo. Bolsa do cirro desenvolvida, pré-acetabular, situada entre o acetábulo e a bifurcação cecal, inicia-se imediatamente junto ao bordo anterior do acetábulo, na linha mediana do corpo, dirige-se para a margem lateral, fazendo às vezes um trajeto mais ou menos reto e outras vezes recurvando-se para cima ou para baixo, terminando em geral na margem lateral do corpo e outras vezes a pouca distância desta. Contem a bolsa do cirro uma vesícula seminal enovelada, duto ejaculador e cirro tubular e inerme. Mede a bolsa do cirro de 0,589 a 1,030mm de comprimento por 0,147 a 0,220mm de maior largura. Poro genital pré-acetabular, post-bifurcal, às vezes proximo do nivel do bordo anterior do acetábulo, de acôrdo com a curvatura para cima ou para baixo da bolsa do cirro, na margem lateral do corpo. Aberturas genitais masculina e feminina contíguas, com ausência de atrio genital. Ovário sempre esferóide, post-aceta-

bular e pré-testicular, de superfície lisa, colocado em geral na linha mediana do corpo ou às vezes em situação para-mediana, medindo de 0,258 a 0,626mm de diâmetro transversal. Receptáculo seminal presente, em geral alongado, imediatamente abaixo do ovário, geralmente deslocado para a direita ou para a esquerda dêste, medindo de 0,250 a 0,418mm de diâmetro longitudinal por 0,076 a 0,228mm de diâmetro transversal. Glândula de Mehlis presente, no bordo posterior do ovário. Canal de Laurer forte, longo. Útero extremamente sinuoso, ramo descendente iniciando-se no bordo posterior do ovário, dirige-se para baixo formando numerosas circunvoluções, atinge a extremidade posterior do corpo, volta-se em direção à extremidade anterior do corpo, constituindo o ramo ascendente que também é dotado de numerosas circunvoluções. Quando alcança o nível do bordo anterior do acetábulo curva-se bruscamente em direção à margem lateral do corpo onde se diferencia em vagina. O útero é intra-cecal e cecal. Vagina pouco desenvolvida, pré-acetabular, lateral à linha mediana, na margem do corpo, acompanhando em toda a extensão a bolsa do cirro e termina na margem lateral do corpo onde às vezes se projeta, como o cirro, para fóra. Mede a vagina de 0,266 a 0,4450mm de comprimento por 0,045 a 0,091mm de largura. Ovos numerosos, operculados, de casca delgada, medindo de 0,027 a 0,042mm de comprimento por 0,015 a 0,023mm de largura. Vitelinos intra-cecais, cecais e extra-cecais, formados por numerosos cachos de ácinos volumosos, de extensão variável, iniciando-se a meio caminho entre o ovário e o acetábulo e terminando também a meio caminho entre a terminal cecal e a extremidade posterior do corpo. Em alguns exemplares podem os vitelinos ter início ao nível do bordo anterior do ovário e terminar ao nível da extremidade cecal ou pouco antes desta.

Vesícula excretora em forma de *Y* com o ramo impar muito longo.

Localização — Pulmão.

Distr. geograf. — Praia Grande, Santos, São Paulo.

Aparelho excretor

O aparelho excretor foi decalcado de exemplares vivos comprimidos entre lâmina e lamínula.

Vesícula excretora — A vesícula excretora é ampla, de superfície mais ou menos regular. Inicia-se na extremidade posterior do corpo onde se localiza o poro excretor, dirige-se em direção à extremidade anterior do corpo passando entre os testículos. A extremidade basal da vesícula excretora é passível de dilatações que às vezes enchem quase que completamente esta região do corpo. A bifurcação da vesícula se dá ao nível do bordo posterior do ovário, emitindo dois ramos calibrosos, bastante dilatáveis, sendo um dos ramos sempre mais longo que o outro.

Canal coletor primário — Tem origem próxima do bordo anterior dos ramos da vesícula excretora, dirige-se em direção à extremidade anterior e margem lateral e bifurca-se na zona do acetábulo dando origem aos dois canais coletores secundários, sendo um em direção à extremidade anterior (canal coletor secundário anterior) e outro em direção à extremidade posterior (canal coletor secundário posterior). Do canal coletor secundário anterior só pudemos observá-lo até mais ou menos ao nível da bifurcação cecal e, do canal coletor secundário posterior, a observação só foi possivel até ao nível da bifurcação da vesícula excretora. Só conseguimos, por outro lado, determinar 3 células vibráteis próximas do acetábulo, uma próxima do testículo anterior e 3 juntas ao fundo de saco da terminação cecal.

Posição sistemática do gênero Bieria, *gen. n.*

Pela situação do poro genital, bolsa do cirro e vagina, o gênero *Bieria*, gen. n., se aproxima muito do gênero *Ochetosoma Braun*, 1901 (= *Renifer* Pratt, 1902), diferindo no entanto dêste gênero quer pela forma do corpo, conformação uterina, vitelinos, disposição das gônadas, quer pela localização no hospedador. A forma do corpo lembra *Haplometroides* Odhner, 1911 do qual com facilidade se distingue pela situação da bolsa do cirro, poro genital e vagina e pela disposição dos vitelinos. Pela disposição dos vitelinos, conformação geral, tipo uterino, hospedador e localização neste, se aproxima muito de *Liophistrema* Artigas, Ruiz & Leão, 1942, do qual facilmente se separa pela situação do poro genital, bolsa do cirro e vagina. É também muito próximo de *Glossidiella* Travassos, 1928 do qual se afasta quer pela extensão dos cecos quer pela situação do poro genital e vagina.

Glossidiella Travassos, 1928, *Liophistrema* Artigas, Ruiz & Leão, 1942 e *Bieria*, gen. n. parecem mesmo formar um grupo muito homogêneo.

Até que novos conhecimentos filogenéticos sejam acumulados ou até que consigamos mais material no qual possamos estudar com pormenores o aparelho excretor de *Liophistrema* Artigas, Ruiz & Leão, 1942 e examinar os tipos de *Glossidiella* Travassos, 1928, achamos razoável incluir o gênero *Bieria*, gen. n. entre os *Liophistrematinae* Artigas, Ruiz & Leão, 1942 (*), modificando-se a diagnose desta sub-família de maneira a comportar também trematóides de bolsa do cirro, vagina e poro genital pré-acetabular e post-bifurcal e poro genital marginal, pois são êstes os principais caracteres que servem para distinguir *Bieria*, gen. n. de *Liophistrema* Artigas, Ruiz & Leão, 1942.

(*) Em 1942 quando foi erigida esta sub-família, derivando-a de *Liophistrema*, foi ela designada *Liophistreminae* que deve ser mudado para *Liophistrematinae*.

O material do presente estudo, constituido por 32 exemplares, acha-se depositado na coleção do Laboratório de Parasitologia do Instituto Butantan sob o No. 5.671.

RESUMO

No presente trabalho é descrito um novo gênero e espécie de trematóide parasito do pulmão de *Liophis miliaris* (L.).

O novo gênero descrito (*Bieria*, gen. n.) parece ter estreito parentesco com *Liophistrema* Artigas, Ruiz & Leão, 1942, sendo porisso colocado, sistematicamente, ao lado dêste entre os *Liophistrematinae* Artigas, Ruiz & Leão.

ABSTRACT

In the present paper a new trematode genus and species (*Bieria artigasi*, n. g., n. sp.) is described.

The worm in question was found in the lung of a Brazilian-non poisonous snake *Liophis miliaris* (Linneu), from Santos, State of São Paulo, Brazil.

The new genus seems to be close allied to *Liophistrema* Artigas, Ruiz & Leão, 1942, being therefore included between the *Liophistrematinae* Artigas, Ruiz & Leão, 1942.

Bieria, n. g.

Liophistrematinae — Cirrus pouch close in front of the ventral sucker, in a transverse position. Genital opening in the lateral margin of body, in the anterior level of acetabulum. Ovary spherical, posterior do acetabulum, in front of testis. Testis rounded or oval, tandem, sometime in an oblique position. Receptaculum seminis, Laurer's canal and Mehlis' gland present. Vitellaria intercaecal, caecal and extracaecal, composed of clusters extending half way between ventral sucker and ovary and reaching a level posterior to end of caeca, half way between end of body and extremities of caeca.

Type species — *Bieria artigasi*, n. sp.

O nome genérico é dado em homenagem ao prof. dr. Otto Bier, sem cujo apoio teria sido impossivel a realização dêste trabalho. O nome específico homenageia o prof. dr Paulo T. Artigas, em agradecimento pelo constante incentivo.

BIBLIOGRAFIA

1. *Artigas, P. de T.; Ruiz, J. M. & Leão, A. T.* Trematóides de Ofidios, *Mem. Inst. Butantan*, 16:157, 1942
2. *Travassos, Lauro.* Trematodeos novos, *Boletim Biológico*, (7):95, 1928.

Damos um quadro de medidas de 10 exemplares escolhidos ao acaso.

EXEMPLAR	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
Comprimento	17,000	12,000	17,000	12,000	12,000	10,000	16,000	15,000	16,000	14,000
Largura	2,024	2,024	1,472	1,251	1,159	1,619	1,288	1,435	1,932	1,288
Ventosa oral { Compr. Larg.	0,552 0,625	0,552 0,644	0,460 0,552	0,423 0,515	0,412 0,515	0,497 0,644	0,405 0,478	0,478 0,533	0,552 0,662	0,460 0,497
Pré-faringe	0,212	0,091	0,099	0,076	0,106	0,053	0,038	0,076	0,076	0,076
Faringe ... { Compr. Larg.	0,235 0,372	0,266 0,319	0,152 0,304	0,174 0,289	0,182 0,228	0,205 0,228	0,190 0,281	0,212 0,319	0,266 0,380	0,220 0,281
Acetábulo . { Compr. Larg.	0,810 0,846	0,957 1,067	0,736 0,699	0,681 0,717	0,681 0,644	0,791 0,883	0,644 0,607	0,736 0,736	0,883 1,030	0,736 0,681
Distância entre as VV.	1,564	1,159	1,427	1,067	1,104	1,049	1,288	1,380	1,527	1,288
Esôfago	0,423	0,404	0,460	0,405	0,404	0,423	0,405	0,405	0,460	0,552
Ovário .... { Compr. Larg.	0,626 0,552	0,535 0,386	0,570 0,515	0,258 0,243	0,460 0,460	0,515 0,552	0,570 0,460	0,534 0,515	0,497 0,460	0,534 0,589
R. Seminal . { Compr. Larg.	0,350 0,205	0,250 0,159	0,418 0,175	0,289 0,076	0,281 0,175	0,266 0,228	0,331 0,165	0,296 0,228	0,342 0,190	0,339 0,184
Test. anterior { Compr. Larg.	0,920 0,497	0,625 0,515	0,736 0,533	0,809 0,626	0,699 0,423	0,791 0,662	0,736 0,423	0,662 0,644	0,865 0,681	0,791 0,368
Test. post. . { Compr. Larg.	1,104 0,552	0,883 0,460	0,773 0,478	0,773 0,515	0,717 0,478	0,883 0,607	0,754 0,478	0,883 0,368	1,104 0,552	0,663 0,423
B. Cirro .. { Compr. Larg.	1,030 0,220	0,736 0,152	0,772 0,184	0,699 0,166	0,589 0,184	0,662 0,166	0,699 0,147	0,791 0,202	0,956 0,203	0,681 0,184
Vagina .... { Compr. Larg.	0,331 0,075	0,380 0,076	0,380 0,053	0,342 0,091	0,266 0,053	0,304 0,076	0,304 0,045	0,304 0,068	0,450 0,045	0,304 0,054
Ovos ...... { Compr. Larg.	0,034 0,019	? ?	0,034 0,015	0,027 0,019	0,042 0,023	0,034 0,015	0,034 0,019	0,038 0,019	0,042 0,023	0,038 0,019
Term. cec. à extr. posterior	4,600	3,496	4,876	3,680	4,550	3,467	4,968	5,888	4,048	4,784

N. B. Todas as medidas se referem a milimetros.

Fig. 1
...tigasi, gen. n., sp. n. — Vista total.

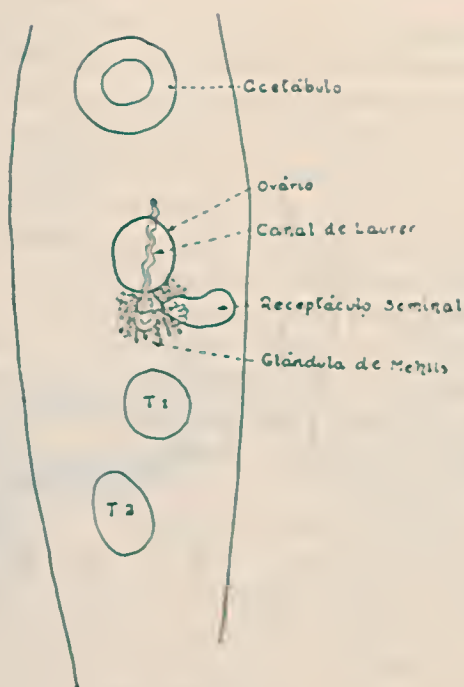



Fig. 2
Bieria artigasi, gen. n., sp. n. — Detalhes do aparelho genital. — Desenho feito à mão livre, ao microscópio, de exemplares vivos, comprimidos entre a lâmina e lamínula.

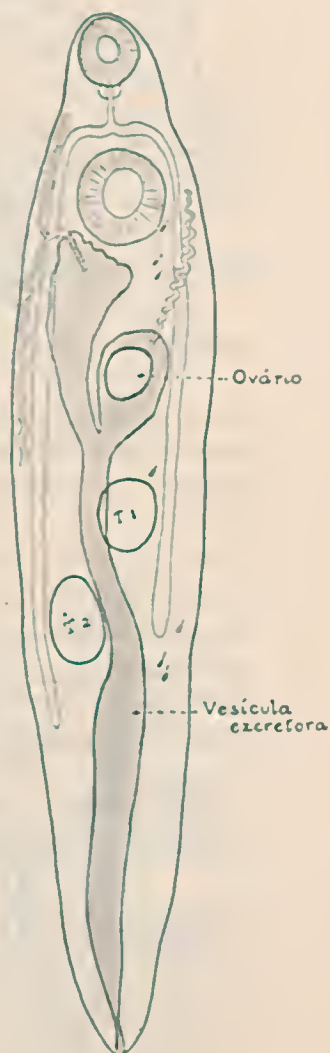



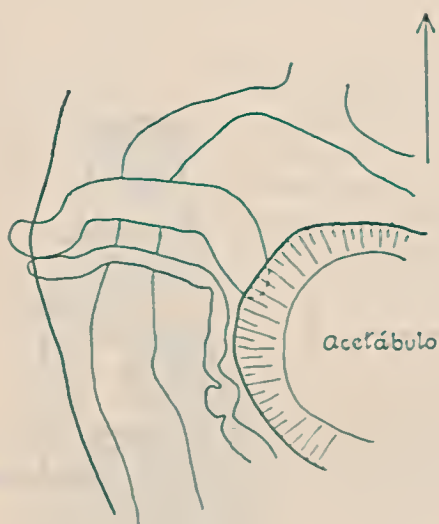
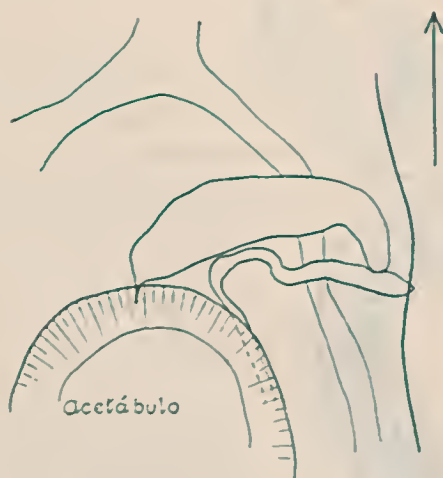
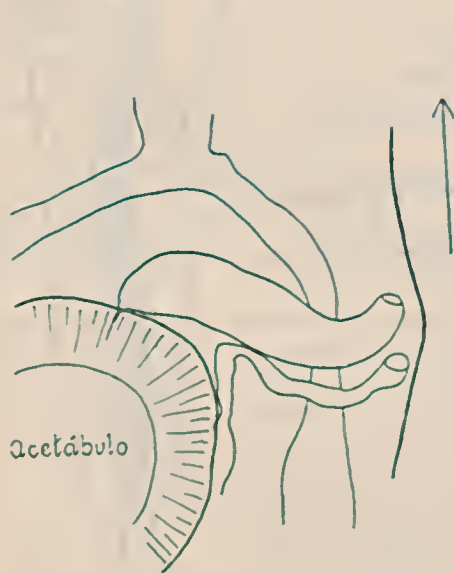
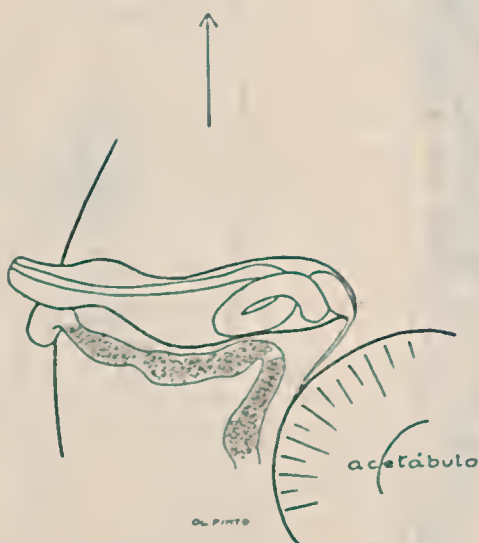
Fig. 3
Bieria artigasi, gen. n., sp. n. — Aparelho excretor. Desenho feito à mão livre, ao microscópio, de exemplares vivos, comprimidos entre a lâmina e lamínula.

Figs. 4, 5 e 6 — *Bieria artigasi*, gen. n., sp. n. — Desenhos esquemáticos para mostrar as pequenas variações notadas na posição da bolsa do cirro e vagina, bem como na situação das aberturas genitais.

Fig. 7 — *Bieria artigasi*, gen. n., sp. n — Bolsa do cirro e vagina.

ESTUDOS SÔBRE O TRATAMENTO DA INFECÇÃO TÍFICA EXPERIMENTAL DO CAMUNDONGO

I. *Comportamento "in vitro" e "in vivo" de várias substâncias*

POR E. BIOCCA & J. P. AMARAL
(Do Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan, S. Paulo, Brasil)

A febre tifóide é uma infecção contra a qual ainda não parece existir uma terapêutica específica verdadeiramente eficaz.

Algumas tentativas feitas com ácido mandélico no tratamento da infecção tífica experimental (1) deram resultados duvidosos.

Relativamente escassos são os estudos realizados com compostos orgânicos do enxofre nesta infecção.

Em 1937, Buttle & col. (2) mostraram que a sulfanilamida protege os camundongos contra algumas dóses mínimas letais de bacilos tíficos, mas que êstes resultados são bem inferiores aos obtidos, nas mesmas condições, contra infecções devidas ao estreptococo hemolítico ou ao meningococo.

Derivados da sulfanilamida foram igualmente ensaiados. Fisk (3) observou que a sulfapiridina e o sulfametiltiazol são um pouco mais eficazes do que a sulfanilamida na infecção experimental do camundongo; de outro lado, Kolmer & Rule (4) obtiveram melhores resultados com sulfanilamida que com sulfapiridina ou sulfatiazol na infecção experimental crônica do coelho produzida pelo b. tífico.

Libby & Joiner (5) assinalaram "in vitro" uma ação bacteriostática do sulfatiazol mais elevada que da sulfanilamida e da sulfapiridina.

Os trabalhos clínicos sôbre a ação das sulfas nos doentes e nos portadores de bacilos tíficos são um pouco contraditórios e insuficientes para dar uma idéia precisa do valor destas drogas.

A maioria dos autores teria observado uma ação benéfica de muitas sulfas no tratamento da infecção tífica (6. 7). As observações bastante extensas de Hall (8) teriam mostrado, porém, que a sulfaguanidina seria absolutamente inativa.

Os resultados relatados em 1943 por Hoagland (9) sôbre a ineficácia do sulfatiazol no tratamento da infecção tífica não podem ser aceitos sem restrições porque as quantidades de sulfatiazol usadas foram relativamente baixas e administradas durante prazo insuficiente.

Entre as substâncias antimicrobianas de origem biológica usadas no tratamento da infecção tífica, merecem ser lembrados, o sôro, o bacteriófago antitíficos e, recentemente, a estreptomicina.

Recebido para publicação em 16 de fevereiro de 1946.

Felix & Pitt (10) demonstraram nos camundongos que os sôros que continham anticorpos O e Vi possuiam dois diferentes efeitos sôbre a infecção tífica. Um efeito protetor contra a rápida multiplicação dos germes virulentos era produzido pelo anticorpo Vi; um efeito anti-endotóxico, neutralizante das endotoxinas era produzido pelo anticorpo O.

Felix (11) e logo depois McSweeney (12) obtiveram resultados encorajadores no tratamento de casos humanos de febre tifóide com sôros ricos nestes anticorpos. Cookson e Facey (13) estudaram o sôro de Felix em 73 doentes e puderam confirmar a ação evidente dêste sôro sôbre os sintomas tóxicos, observando muitas vêzes encurtamento do período febril: a letalidade global, porém, não pareceu particularmente beneficiada pelo tratamento.

Resultados satisfatórios foram também obtidos por Yu e outros (14) na febre tifóide tratada com sôro específico.

Discordantes são os resultados de Hoagland (9), mas os sôros terapêuticos usados por êste A. eram sôros de indivíduos vacinados, dos quais não foi feito um estudo sistemático.

De particular interêsse são as observações sôbre o tratamento da infecção tífica experimental do camundongo com bacteriófago específico.

Asheshov, Wilson & Topley (15) demonstraram que o fago antitífico e sobretudo o fago específico contra o antígeno Vi protege os camundongos infectados com muitas dóses mortais de bacilos tíficos, ainda que administrado algumas horas depois da infecção.

O bacteriófago exibe esta atividade mesmo quando inoculado por via parenteral, em virtude do fato de não ser bloqueado no seu poder protetor nem pelo sangue, nem pelos tecidos.

Prudentemente observaram os autores, porém, que a infecção tífica experimental do camundongo é uma infecção muito rápida e violenta, sendo, portanto, perigoso tirar destas observações conclusões para outros tipos de infecções tíficas como as que se realizam no homem. É fóra de dúvida, entretanto, que os fagos anti-Vi possuem atividade não sómente "in vitro", como "in vivo", mesmo quando o encontro com os germes se realiza ao nível dos tecidos.

Êstes resultados sôbre a ação do fago na infecção tífica experimental do camundongo foram obtidos e ampliados em 1938 por Fisk (16).

Escassos ainda são os trabalhos sistemáticos sôbre a atividade do bacteriófago na infecção tífica humana.

Uma revisão completa dos trabalhos sôbre a atividade do bacteriófago nas infecções intestinais foi recentemente feita por Morton & Engley (17).

Em recente publicação, Reiman e col. (18) salientam o valor terapêutico de uma substância antibiótica de origem microbiana, a estreptomicina, na infecção tífica humana.

* * *

Como contribuição ao estudo da terapêutica específica da infecção tífica, realizamos uma série de pesquizas "in vitro" e "in vivo" sôbre a atividade antitífica de numerosas substâncias, incluindo derivados do ácido benzóico, compostos orgânicos do antimônio, compostos aromáticos halogenados, azocompostos, compostos orgânicos do enxofre e precisamente sulfetos, disulfetos, sulfonas e sulfamidas aromáticas. Foram igualmente estudados "in vitro" e "in vivo" o ácido mandélico e o estovarsol.

Entre as substâncias antimicrobianas de origem biológica foram ensaiadas, "in vivo", a piocianina e a penicilina.

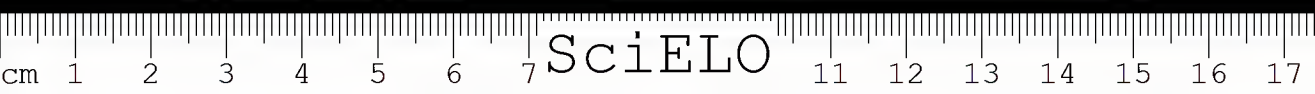
Técnica — Todas as drogas foram estudadas em sua atividade bacteriostática "in vitro" diluindo a substância no agar na proporção de 1:500, de maneira a assegurar uma difusão homogênea do produto. Solidificado o agar, era feita a semeadura com uma quantidade uniforme de uma suspensão de bacilos tíficos (amostra Ty 2). Depois de 24 horas procedia-se à leitura dos resultados marcando com +++ a inhibição completa do crescimento; com ++ inhibição fraca e + inhibição mínima.

As provas "in vivo" foram todas realizadas (com exceção das com piocianina e penicilina), suspendendo as substâncias em óleo de amendoim na proporção de 2,5% e injetando lotes de 10 camundongos com 0,5 ml da suspensão, por via subcutânea. Logo após a inoculação da suspensão oleosa da droga, os camundongos recebiam no peritôneo um número de bacilos tíficos correspondente a 5 doses mínimas letais.

Devemos observar que a D.M.L. da cultura foi sempre estandardizada e usada sem mucina, não podendo portanto nossos índices de proteção serem comparados aos testes feitos com mucina. (*)

Foram considerados protegidos os animais que sobreviveram além de 4 dias depois da infecção.

As provas com penicilina e piocianina foram executadas usando a mesma técnica já descrita no nosso precedente trabalho sôbre quimioterapia da infecção meningocócica (19). Foram realizadas experiências com quantidades crescentes das respectivas drogas: a quantidade máxima de penicilina, inoculada em uma experiencia, correspondeu a 4 doses de 100 U. O. injetadas contemporaneamente, 2, 4 e 6 horas após a infecção: a quantidade máxima de piocianina correspondeu a 3 doses de 0,5 mg do produto, dissolvido em solução fisiologica e injetado contemporaneamente, 2 e 4 horas após a infecção. O número de bacilos tíficos

(*) Um de nós (Amaral) em colaboração com Lacerda, verificou recentemente a relação entre os índices de proteção da vacina tífica em camundongos infectados mediante a inoculação intraperitoneal da amostra Ty2, com ou sem mucina: calculado o número de D.M.L. a partir da série contrôle injetada com a suspensão em mucina, conclui-se por uma proteção no mínimo 100 vezes maior do que no caso em que a aferição do número de D.M.L. do *inoculum* é feita em série de camundongos inoculados com suspensão de germes em solução salina, sem mucina.

inoculados nos camundongos correspondeu, também nestas experiencias, a 5 doses minimas letais, em solução fisiologica sem mucina.

Nas tabelas são marcadas com

+ = 20 — 30% de protegidos
++ = 40 — 50% de protegidos
+++ = 60 — 70% de protegidos
++++ = 80 — 100% de protegidos

RESULTADOS

TABELA I

COMPOSTO	Atividade	
	in vitro	in vivo
$C_6H_5.COOH$	+++	—
p-$NH_2.C_6H_4.COOH$	+++	—
p-$NH_2.C_6H_4.COONa$	+++	—
p-$CCl_3CO.NH.C_6H_4.COOH$	+++	—
p-$NO_2.C_6H_4.CONH_2$	+++	—
$C_6H_5.CH(OH).COOH$	+	—
Estovarsol	+++	—
p-$CCl_3CO.NH.C_6H_4.I$	—	—
p-$CCl_3CO.NH.C_6H_4.OCH_3$	+	—
p-$CCl_3CO.NH.C_6H_4.OC_2H_5$	—	—
2,4,6-$Br_3.C_6H_2.NH.COCCl_3$	—	—

TABELA II

AZOCOMPOSTO	Atividade	
	in vitro	in vivo
p-$NH_2.C_6H_4.N:N.C_6H_5$	—	—
$C_6H_5.N:N.NH.C_6H_5$	—	—
$C_{10}H_6$ / $N:N.C_6H_5$ (1) \ $NH.COCCl_3$ (2)	—	—
$C_{10}H_6$ / $N:N.C_6H_5$ (1) \ $NH.COCCl_3$ (4)	—	—

TABELA III

COMPOSTO ANTIMONIAL	Atividade	
	in vitro	in vivo
R.Cl	+++	—
$R.S.C_6H_4.NO_2$-p	+++	—
$R.S.S.C_6H_4.SbO_3H_2$-p	+++	—
$R.SO_2.C_6H_4.SbO_3H_2$-p	+++	—
$R.SO_2NH_2$	+++	tóxico
$R.SO_2.NH.C_5H_4N$ (comp. 152 M)	++	—
$R.SO_2.NH.C_3H_2NS$ (comp. 153 M)	+++	—
$R.SO_2.NH.C_4H_3N_2$ (comp. 154 M)	+++	tóxico
$R.SO_2.NH.C_5H_5N_2$ (comp. 155 M)	+++	tóxico
$R.SO_2.NH.C(:NH)NH_2$ (comp. 156 M)	++	tóxico

sendo R = — C_6H_4 — SbO_3H_2

TABELA IV

SULFA	Atividade	
	in vitro	in vivo
Sulfanilamida	±	++
N¹-acetil-sulfanilamida (Albucid)	+	+
N⁴-tricloroacetil-sulfanilamida	+++	+
N⁴-nicotinil-sulfanilamida	—	+
N⁴-sucinil-sulfanilamida	—	++
Neo-Uliron	—	++
Sulfatiazol	+++	++
4-Metil-sulfatiazol	±	++
N⁴-tricloroacetil-sulfatiazol	+++	++
Sulfapiridina	±	+
Sulfadiazina	+++	++
Sulfamerazina	+++	++
Sulfaguanidina	—	++

TABELA V

COMPOSTO	Atividade	
	in vitro	in vivo
$p\text{-}NO_2.C_6H_4.S.C_6H_4.NH_2\text{-}p'$	—	—
$p\text{-}NO_2.C_6H_4.S.C_6H_4.NH.COCH_3\text{-}p'$	—	—
$(p\text{-}NH_2.C_6H_4\text{-})_2S$	+++	+
$(p\text{-}NO_2.C_6H_4\text{-})_2S_2$	—	+
$(p\text{-}Br.C_6H_4\text{-})_2S_2$	—	—
$p\text{-}NO_2.C_6H_4.SO_2.C_6H_4.N:CH.C_6H_5$	—	—
$p\text{-}NO_2.C_6H_4.SO_2.C_6H_4.N:CH.C_6H_4.OCH_3\text{-}p'$	—	—
$p\text{-}NO_2.C_6H_4.SO_2.C_6H_4.N:CH.CH:CH.C_6H_5$	—	—
$(p\text{-}H.CO.NH.C_6H_4\text{-})_2SO_2$	—	—
$(p\text{-}CCl_3CO.NH.C_6H_4\text{-})_2SO_2$	—	+
$(p\text{-}NaSO_3CH_2.NH.C_6H_4\text{-})_2SO_2$	—	—

Nas Tabelas 1 a 5 são relatados os resultados das provas "in vitro" e "in vivo" obtidas com as diferentes substâncias.

Das numerosas séries de produtos estudados merecem ser lembrados, pelos seus resultados protetores, todas as sulfas, o dinitrodifenilsulfeto, o diaminodifenilsulfeto e o tricloroacetil derivado da diaminodifenilsulfona ("Diclorona"), produto de particular interêsse também para a quimioterapia das infecções produzidas por germes alcool ácido resistentes.

O ácido mandélico e o estovarsol, amplamente usados no tratamento das infecções intestinais, não evidenciaram atividade protetora na infecção tífica experimental do camundongo. Igualmente inativos "in vivo" foram os dois produtos antibióticos de origem microbiana usados, a piocianina e a penicilina.

Parece-nos útil, enfim, salientar a comparação por nós feita entre a atividade bacteriostática "in vitro" e protetora "in vivo" das numerosas substâncias estudadas. O ácido benzóico e seus derivados, assim como os compostos orgânicos do antimônio manifestaram uma forte ação anti-tífica "in vitro", que não correspondeu a uma igual atividade protetora "in vivo".

A maioria das sulfas, como já dissemos, protegeu uma pequena porcentagem dos animais infectados e geralmente inhibiu o crescimento dos bacilos tíficos nos tubos, porém alguns produtos foram muito mais ativos do que outros "in vitro", sem que paralelamente exibissem maior atividade protetora.

Nos outros compostos estudados a correspondência entre as duas provas foi relativamente constante. O valor das provas "in vitro", porém, parece ser somente preliminar e nenhuma dedução pode ser tirada dos resultados, a não ser um indício para os trabalhos "in vivo".

RESUMO

Foi estudada a atividade bacteriostática antitífica "in vitro" e a atividade protetora "in vivo" (na infecção tífica experimental do camundongo) de várias substâncias químicas (derivados de ácido benzóico, compostos orgânicos antimoniais, azocompostos, compostos aromáticos halogenados, compostos orgânicos de S e precisamente sulfetos, sulfonas e sulfamidas aromáticas) em relação a u'a amostra virulenta de bacilos tíficos (Ty2).

Os derivados do ácido benzóico e os compostos orgânicos do antimônio mostraram evidente ação bacteriostática "in vitro", porém foram desprovidos de valor protetor "in vivo".

Quanto aos derivados orgânicos do enxofre, foram em sua maioria inativos "in vitro" e "in vivo" os sulfetos, disulfetos e as sulfonas aromáticas, com exceção do pp-dinitrodifenilsulfeto, pp-diaminodifenisulfeto e diclorona; pelo contrário, as sulfas (em número de 13) exibiram quase sempre atividade bacteriostática "in vitro" e fraca mas clara ação protetora na infecção experimental dos camundongos.

O estovarsol e o ácido mandélico foram inativos "in vitro" e "in vivo".

Da mesma forma inativas "in vivo" foram as duas substâncias antibióticas de origem microbiana estudadas, a saber, a piocianina e a penicilina.

ABSTRACT

A number of chemical substances (derivatives of the benzoic acid, organic antimony compounds, azo-compounds, halogen aromatic compounds, sulfur compounds and precisely sulfides, sulfones and aromatic sulfamides), as well as two antibiotics (penicillin and pyocyanin) have been tested for their antibacterial activity "in vitro" and "in vivo" (protection tests in mice) against a virulent strain of *E. typhosa* (Ty2).

Derivatives of the benzoic acid and organic antimony compounds demonstrated an evident bacteriostatic action "in vitro", but no protective activity "in vivo".

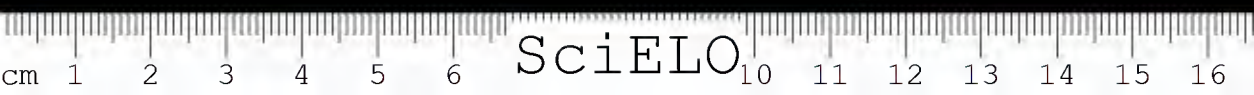
The organic sulfides, disulfides and the aromatic sulfones studied were mostly inactive "in vitro" and all inactive " in vivo" except pp.dinitrodiphenylsulfide, pp. diaminodiphenylsulfide and diclorone; on the contrary, the sulfas (in the number of 13) had in the majority bacteriostatic activity "in vitro" and light but clear protective action in the experimental infection of mice.

The stovarsol and the mandelic acid were inactive "in vitro" and "in vivo".

The pyocyanin and the penicillin, antibiotic substances, from microbian origin, gave, in the same way, negative results "in vivo".

BIBLIOGRAFIA

1. *Kleeberg, S.* Influence of mandelic acid on course of typhoid fever, *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. a. Hyg.*, **35**:191, 1941.
2. *Buttle, G. A. H.; Parish, H. J.; McLeod, M. & Stephenson, D.* The chemotherapy of typhoid and some other non-streptococcal infections in mice, *The Lancet*, **1**:681, 1937.
3. *Fisk, R. T.* Therapeutic properties of sulfanilamide and related drugs in experimental typhoid infection of mice, *J. Inf. Dis.*, **68**:20, 1941.
4. *Kolmer, J. A. & Rule, A. M.* Sulfonamide compounds in treatment of experimental B. typhosus (E. typhosus) infections of rabbits, *Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med.*, **48**:388, 1941.
5. *Libby, R. L. & Joyner, A. L.* The action of sulfathiazole on the colon-typhoid-dysenteriae group of organisms, *J. Inf. Dis.*, **67**:67, 1940.
6. *Harries, E. H. R.; Swyer, R. & Thompson, N.* Sulphanilamide in typhoid fever, *The Lancet*, **1**:1321, 1939.
7. *Weilbaecher, J. O.; Moss, S. E.; Taylor, H. M. & Dupuy, H.* The treatment of typhoid fever by the thiazole derivatives of sulfanilamide, *Southern Med. J.*, **33**:645, 1940.
8. *Hall, W. M.* Use of sulfaguanidine in controlled series of typhoid cases, *New Orleans Med. and Surg. J.*, **94**:283, 1941.
9. *Hoagland, R. J.* Specific treatment of typhoid. The ineffectiveness of sulfathiazole and immune serum, *J. Amer. Med. Assn.*, **122**:653, 1943.
10. *Felix, A. & Pitt, R. M.* A new antigen of B. typhosus, *The Lancet*, **2**:186, 1934.
11. *Felix, A.* Clinical trials with a new anti-typhoid serum, *The Lancet*, **1**:799, 1935.
12. *McSweeney, C. J.* Clinical trials with a new anti-typhoid serum, *The Lancet*, **1**:1095, 1935.
13. *Cookson, H. & Facey, R. V.* Value of a specific serum in the treatment of typhoid fever, *Brit. Med. J.*, **1**:1009, 1937.
14. *Yu, H.* Further studies on serum treatment of typhoid fever, *Chinese Med. J.*, **56**:29, 1939; *resumo in Biological Abstracts*, 1939.
15. *Asheshov, I. N.; Wilson, J. & Topley, W. W.* The effect of an anti-Vi bacteriophage on typhoid infection in mice, *The Lancet*, **1**:319, 1937.
16. *Fisk R. T.* Protective action of typhoid phage on experimental typhoid infection in mice *Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med.* **38**:659 1938.
17. *Morton, H. E. & Engley, F. B.* Dysentery bacteriophage, *J. Amer. Med. Assn.*, **127**:584, 1945.
18. *Reimann, H. A.; Elias, W. F. & Price, A. H.* Streptomycin for typhoid. A pharmacologic study, *J. Amer. Med. Assn.*, **128**:175, 1945.
19. *Biocca, E.; Amaral, J. P. & Bier, O.* Estudos sôbre a quimioterapia da infecção meningocócica, *Mem. Inst. Butantan*, **18**:37, 1944-1945.

Mem. Inst. Butantan.
19 49-58, 1946.

ESTUDOS SÔBRE O TRATAMENTO DA INFECÇÃO TÍFICA EXPERIMENTAL DO CAMUNDONGO

II. Sinergismo entre medicamentos químicos sintéticos e medicamentos de origem biológica

POR E. BIOCCA & J. P. AMARAL
(Do Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan, S. Paulo, Brasil)

As possibilidades de vantagem terapêutica pela administração combinada de drogas são inúmeras. Assim, por exemplo, duas substâncias que produzem o mesmo efeito terapêutico, mas cuja ação tóxica é exercida em órgãos diferentes, podem produzir efeito terapêutico sinérgico sem aumento evidente do efeito tóxico.

Do mesmo modo, uma droga rapidamente assimilável e eliminável, associada a outra de absorção e eliminação lentas, podem produzir um efeito rápido inicial seguido de uma continuação demorada do mesmo.

É igualmente conhecido que, em muitos casos de resistência de germes a medicamentos, êsse perigo pode ser prevenido ou mesmo abolido pela associação racional de drogas.

No moderno campo da quimioterapia as observações sôbre sinergismo de medicamentos são ricas de exemplos encorajadores.

O sucesso destas tentativas, porém, está em grande parte ligado ao estudo e ao conhecimento seja do metabolismo dos germes, seja do mecanismo de ação das substâncias terapêuticas empregadas.

Nestes últimos anos, multiplicando-se os trabalhos sôbre o metabolismo de germes, foram isolados numerosos fatores de importância vital para os mesmos; alguns dêstes fatores, como o ácido pantotênico, a biotina, o ácido paraaminobenzóico, foram classificados no grupo das vitaminas utilizadas pelos organismos superiores.

Na esperança de se obter substâncias quimioterápicas, foram preparados compostos que antagonizavam o efeito dos fatores de crescimento como o ácido fosfanílico, 4-4'diaminobenzofenone, etc., (1) antagônicos do ácido para-aminobenzóico.

A idéia de procurar produtos terapêuticos em substâncias com fórmula química semelhante, mas com função contrária aos fatores de crescimento, foi utilizada também no preparo da pantoiltaurina, semelhante e antagônica ao ácido

Recebido para publicação em 16 de fevereiro de 1946.

pantotênico. A pantoiltaurina antagonizando a ação do ácido pantotênico. metabolito essencial para o estreptococo, inibe "in vitro" e "in vivo", em determinadas condições, o crescimento do estreptococo piogênico (2).

Roblin & col. (3) procuraram preparar substâncias antagônicas de alguns inibidores secundários das sulfas, na hipótese de que a união dêles produzisse um sinergismo terapêutico.

Uma completa revisão dêste assunto foi recentemente publicada por Peterson & Peterson (4).

Muito confuso é ainda o nosso conhecimento sôbre o mecanismo da ação da maioria das drogas.

As sulfas, como as sulfonas e grande parte das substâncias quimioterápicas, possuem elevado valôr bacteriostático, mas fraco valôr bactericida.

Da mesma forma, a maioria dos agentes quimioterápicos possue ação eletiva para os diferentes microorganismos. Sabe-se que a sulfanilamida, que é muito ativa para os estreptococos, tem ação fraca para os gonococos; que o sulfatiazol é muito ativo para o pneumo, etc.

Existem germes, portanto, contra os quais temos drogas que podemos considerar específicas e germes (como o b. tífico, as salmonelas, o b. da tuberculose, a maioria dos virus filtráveis, etc.) contra os quais as drogas agem de fórma limitada e parcial.

Mudd (5) referindo-se às infecções por virus filtráveis, afirma: "inhibições múltiplas e simultâneas, ao invés de uma só inhibição, podem ser necessárias para suprimir a multiplicação intracelular de um agente infeccioso e, dêste modo, fornecer a chave para uma quimioterapia eficaz".

As condições particularmente propícias para uma associação de medicamentos parecem apresentar-se quando "as substâncias agem de um lado sôbre os quimioceptores dos parasitas e de outro lado sôbre aqueles receptores aos quais se ligam as substâncias protetoras, formadas no organismo em resposta à invasão dos parasitas. Uma terapêutica associada muito eficaz é representada, por isso, pela associação da quimio à soroterapia" (Ehrlich) (6).

O interêsse da associação de uma terapêutica biológica a uma quimioterápica por sulfas, é também salientada por Domagk e Hegler (7), em seu recente tratado sôbre a quimioterapia das infecções bacterianas: "a primeira fase de ação (das sulfas) é representada sempre por um ataque direto aos germes, que porém, só raramente chegam a ser totalmente destruidos, mas que na maioria dos casos são alterados de tal maneira que ficam prontos para serem completamente aniquilados pela defesa do organismo".

Provavelmente as mais brilhantes observações sôbre sinergismo dos medicamentos são as obtidas pela união de produtos quimioterápicos a produtos de origem biológica.

"In vitro" foi demonstrada a ação sinérgica do sulfatiazol e da penicilina sôbre o crescimento do estafilococo dourado e do estreptococo piogênico (8). Igual ação sinérgica foi observada (9) "in vitro" entre penicilina e ácido para-aminobenzóico ou penicilina e sulfapiridina, no crescimento do estafilococo. O trabalho de Jung (10) anota os mesmos resultados na inhibição do crescimento de muitas amostras de brucelas, pela adição ao meio de penicilina e sulfatiazol.

Observações "in vivo" sôbre a ação sinérgica de medicamentos foram realizadas ultimamente sobretudo na infecção experimental por pneumococo, meningococo, b. da tuberculose, Cl. welchii. etc.

Já desde 1912, Neufeld e Engwer (11,12) observaram que no tratamento da infecção pneumocócica experimental a associação do sôro específico à optoquina trazia como consequência o aumento da ação das duas substâncias, levando-se em consideração o efeito de cada uma separadamente.

As mesmas conclusões levaram as observações de Boehncke (13,15), bem como as de Moore (14), mostrando que uma dose de optoquina, incapaz de exercer ação protetora na infecção pneumocócica experimental, podia aumentar muitas vêzes o valor terapêutico do sôro antipneumocócico, quando êste sôro era específico para o tipo do germe causador da infecção.

Depois da descoberta das sulfas, as esperança sôbre associação do sôro antipneumocócico com êstes novos quimioterápicos foram coroadas de êxito e se repetiram com sucesso no tratamento da infecção pneumocócica experimental.

Os trabalhos de Branham & Rosenthal (16) demonstraram que quando as duas substâncias separadamente protegem um número limitado de animais, as duas combinadas protegem quase a totalidade.

Observações análogas foram feitas por Powell & Jamieson (17), McLeod Colin (18) e outros.

Na infecção meningocócica, as provas experimentais em animais deram resultados absolutamente comparáveis aos citados para a infecção penumocócica.

Brown (19) e, a seguir, Branham (20) mostraram que, misturando sôro antimeningocócico com sulfanilamida ou com sulfapiridina, obtinham-se resultados terapêuticos muito superiores àqueles que resultavam da administração das duas substâncias separadas. Foi verificado também que o sôro normal de cavalo não provocava qualquer fenômeno de sinergismo com as drogas. Uma recente estatística clínica executada na Inglaterra parece contradizer êstes resultados, mas o valor de uma estatística clínica, antes de ser aceito, deve ser cuidadosamente discutido (21).

Recentemente, na infecção tuberculosa experimental das cobaias, Smith & McClosky (22) puderam demonstrar que, enquanto que o "Promin" tinha um efeito quimioterápico que podia ser expresso numericamente em 2,4 e a es-

treptomicina em 5,2, a ação das duas drogas dadas em combinação foi de 20 isto é, quase 3 vezes mais do que a soma simples dos efeitos separados.

Merece ser lembrada, enfim, uma última e recente pesquisa sôbre associação de drogas na infecção experimental pelo Cl. welchii. Nesta associação foi usada como antibacteriano a penicilina e como antitóxico um sôro especifico. Quando o tratamento foi iniciado 6 horas depois da infecção, nem a penicilina nem o sôro separados conseguiram salvar a maioria dos animais: misturando-se as duas substâncias foi possível proteger quase todos os animais (23).

Em uma nota precedente relatamos as nossas observações realizadas com a intenção de procurar substâncias ativas contra a infecção experimental do camundongo pelo bacilo tífico.

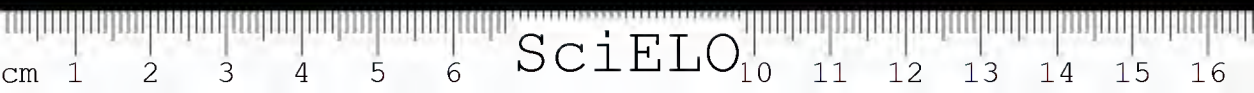
De uma grande série de produtos ensaiados "in vitro" e "in vivo", alguns mostraram possuir uma certa ação terapêutica. Salientaram-se por esta atividade muitas sulfas, em parte conhecidas no seu valor anti-tífico pelos estudos de autores precedentes.

Com nenhuma das drogas estudadas foi possível, porém, obter-se a proteção de 100% dos camundongos infetados com 5 doses mínimas letais de uma suspensão da amostra "Ty2" de b. tífico. As proteções obtidas chegaram no máximo até 40-50%, dos animais tratados. Cumpre lembrar que a dose minima letal de cultura foi sempre aferida em suspensões sem mucina, o que não permite comparar os nossos indices de proteção com outros testes realizados com suspensões em mucina.

Na presente nota são relatados os estudos sôbre terapêutica da infecção tífica experimental realizados pela associação de drogas diferentes.

PARTE EXPERIMENTAL

A técnica usada foi a descrita na nota I. — As drogas foram injetadas em lotes de dez camundongos machos de 18-20 g (0.5 ml subcutâneo de suspensão oleosa a 2,5%), repetindo-se 3 vezes, no mínimo, cada prova. Quando eram associadas duas substâncias químicas inoculava-se respectivamente a metade de cada uma.

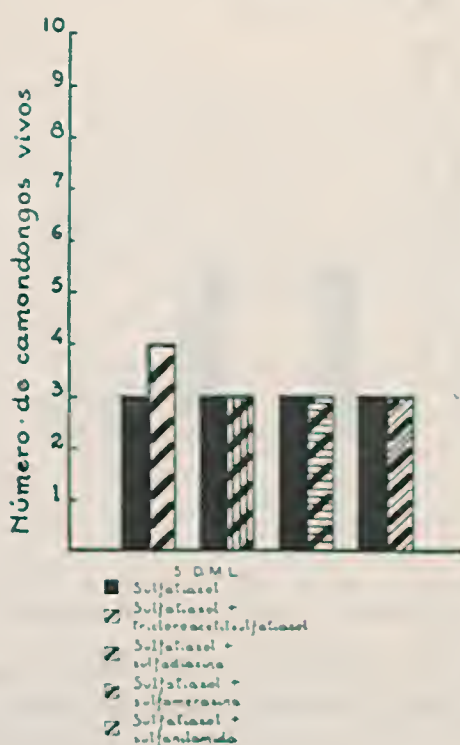
Na associação de substância química com substância de origem biológica, a substância quimica era injetada na quantidade citada (0.5 ml) e a substância de origem biológica nas seguintes proporções: *a*) Penicilina: quatro injeções de 100 U. O., inoculada contemporaneamente, 2,4 e 6 horas após a injeção infetante. b) Sôro antitifico (poder aglutinante o antigeno O 1:25.000, o antigeno Vi 1:1500) 0,40 ml. *c*) Bacteriofago anti-tífico (ativo até a diluição de 1:10.000) 0,5 ml.

Imediatamente depois da injeção das drogas, os camundongos eram inoculados no peritôneo com as suspensões de bacilos tíficos.

A observação dos animais prolongava-se por 4 dias considerando-se protegidos os sobreviventes.

As provas foram realizadas com uma suspensão, em solução fisiologica, sem mucina, de bacilos tíficos (amostra Ty2), devidamente comprovada em relação à sua D. M. L.

1. *Associação de duas sulfas*

A proteção produzida por muitas sulfas na infecção tifosa experimental do camundongo é evidente, mas relativamente fraca, como já foi assinalado na nota precedente.

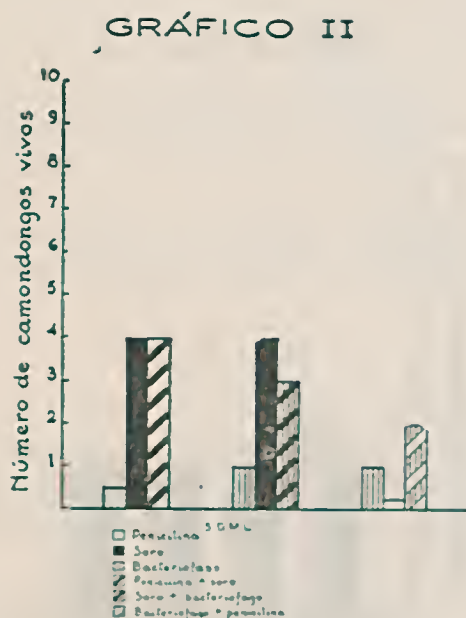
As provas de associação de duas sulfas deram resultados pouco apreciáveis, tal como se pode ver no Gráfico I.

Nenhum fenômeno de potenciação foi possível, pois, observar em consequência da administração contemporânea de duas sulfas na infecção tífica experimental do camundongo.

A proteção obtida foi aproximadamente a mesma que se podia esperar, usando-se cada droga separadamente.

2. *Associação de dois medicamentos de origem biológica*

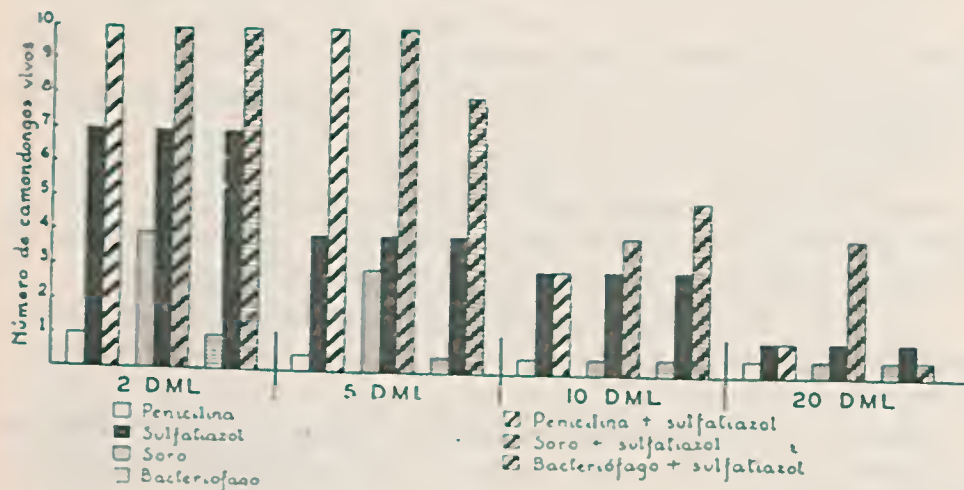
Nestas provas foram usados respectivamente o sôro antitífico, o bacteriófago antitífico e a penicilina, produtos de origem biológica, cujo mecanismo de ação terapêutica é, porém, diferente.

É necessário lembrar que a penicilina tem uma ação insignificante no tratamento da infecção tífica experimental.

Como se pode observar no Gráfico II, os resultados foram negativos não sendo possível evidenciar claros fenômenos de sinergismo neste tipo de associação terapêutica.

3. *Associação de medicamentos químicos a medicamentos de origem biológica*

As melhores condições teóricas para uma tentativa terapêutica de associação encontram-se, segundo os clássicos conceitos de Ehrlich já relatados, quando o ataque ao germe é feito em partes vitais completamente diferentes e isso

se dá, sobretudo, quando ficam associados produtos quimioterápicos a produtos de origem biológica.

Os resultados obtidos, que confirmaram completamente as nossas esperanças, aparecem resumidos no Gráfico III.

Pela observação do Gráfico observa-se claramente que a associação do sulfatiazol com sôro anti-tífico, com bacteriófago anti-tífico ou com penicilina, produziu um sinergismo de ação muito evidente.

Desta forma foi possivel obter a proteção de 100% dos animais inoculados com 5 D. M. L., (excetuando-se a associação com o bateriofago).

Do que se depreende das provas realizadas, a proteção parece ser superior a uma simples somação de efeito.

A ação sinérgica entre sulfatiazol e as diferentes substâncias de origem biológica se evidencia ainda para D. M. L. maiores que 5. Com estas D. M. L. mais altas (20 D. M. L.) observa-se que a associação do sulfatiazol ao sôro anti-tífico parece representar o meio mais eficaz no tratamento da infecção tífica experimental do camundongo.

Êstes resultados encorajadores obtidos em provas experimentais autorizam ulteriores e amplas pesquisas na terapêutica da febre tifóide do homem.

RESUMO E CONCLUSÕES

Foi estudada a eventual ação sinérgica de varios medicamentos no tratamento da infecção tifica experimental do camundongo.

A inoculação de duas diferentes substâncias quimioterápicas (sulfatiazol e sulfamerazina; sulfatiazol e sulfanilamida, etc.) não aumentou a atividade protetora de cada uma usada separadamente.

Da mesma maneira, a inoculação de dois medicamentos de origem biológica (sôro anti-tífico-penicilina, sôro anti-tífico-bacteriófago anti-tífico, penicilina-bacteriófago anti-tífico) não modificou a ação protetora de cada produto.

Ao contrário, a união de um medicamento químico (sulfa) a um medicamento de origem biológica (sôro anti-tífico, penicilina, bacteriófago anti-tífico) elevou fortemente o valor protetor das duas substâncias, quando usadas separadamente.

Numerosas provas mostraram que o sulfatiazol, numa dose que é capaz de proteger 25-40% dos camundongos injetados com b. tífico e um sôro anti-tífico que protege, nas mesmas condições, 20-30% dos camundongos, uma vez que sejam injetados conjuntamente, protegem a totalidade dos animais.

As mesmas observações foram muitas vezes repetidas e confirmadas usando misturas de uma sulfa com outros produtos biológicos como bacteriófago anti-tífico ou penicilina.

Merece ser lembrado que a penicilina, que injetada conjutamente potencia a atividade de uma sulfa, inoculada por si só é quase desprovida de atividade protetora anti-tífica.

ABSTRACT

A study on the synergetic action of several medicaments in the treatment of the experimental typhoid infection of mice is reported.

The inoculation of two different chemotherapic substances (sulfathiazole and sulfamerazine; sulfathiazole and sulfanilamide, etc.) did not increase the protective activity of each one used separately.

Similarly, the inoculation of two medicaments of biological origin (antityphoid serum-penicillin; antityphoid serum-antityphoid bacteriophage; penicillin - antityphoid bacteriophage) did not modify the protective action of each product.

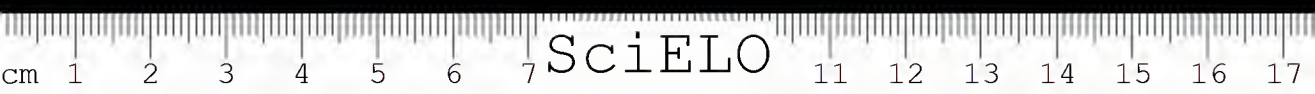
On the contrary the union of a chemical medicament (sulfa) with a medicament of biological origin (antityphoid serum, penicillin, antityphoid bacteriophage) strongly increased the protective action of the two substances when used separately.

Repeated experiments demonstrated that sulfathiazole, in a dose able to protect 25-40% of the mice infected with E. typhosa and a antityphoid serum which protects, under the same conditions, 20-30% of the mice, protect the totality of the animals when injected together.

The same observations were many times repeated and confirmed, using mixtures of a sulfa with other biological products, as antityphoid bacteriophage or penicillin.

It is to remember that the penicillin, which, injected together with sulfas, increases the activity of the sulfa, when injected alone, it is almost without any protective antityphoid activity.

BIBLIOGRAFIA

1. *Kühn, R.; Möller, E. F.; Wendt, G. & Beinert, H.* 4-4'Diamino-benzophenon und andere Schwefelfreie Verbindungen mit Sulfonamidwirkung, *Ber. deut. chem. Ges.*, **75**:711, 1942, *cit.* Peterson and Peterson (4).
2. *Fildes, P.* A rational approach to research in chemotherapy, *The Lancet*, **1**:955, 1940; *McIlwain, H. — Trans. Farad. Soc.*, **39**:359. 1943; cit. *Bol. Med. Brit.*, **2**:85, 1944.
3. *Roblin, R. O.; Lampen, J. O.; English, J. P.; Cole, P. Q. & Vaughan, J. R.* Studies in chemotherapy. VIII. Methionine and purine antagonists and their relation to the sulfonamides, *J. Amer. Chem. Soc.*, **67**:290, 1945.
4. *Peterson, W. H. & Peterson, M. S.* Relation of bacteria to vitamins and other growth factors, *Bact. Reviews. (Soc. of American Bacteriologists)*, **9**:49, 1945.
5. *Mudd, S.* Can chemotherapy be extended to include the intracellular disease agents? *J. of Bact.*, **49**:527, 1945.
6. *Ehrlich, P.* Chemotherapie, Vertrag. Berlim Dahlem 1912 cit. por *Eichbaum, F. W.* in *Rev. Brasil. Med.*, **1**:495, 1944.
7. *Domagk, G. & Hegler, C.* Quimioterapia de las infecciones bacterianas, Buenos Aires, 1944.
8. *Bigger, J. W.* Synergic action of penicillin and sulphonamides, *The Lancet*, **2**:142, 1944.
9. *Ungar, J.* Synergistic effect of para-aminobenzoic acid and sulphapyridine on penicillin, *Nature*, **152**:245, 1943.
10. *Jung, S.* In vitro action of penicillin alone, and in combination with sulfathiazole, on Brucella organisms, *Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med.*, **56**:8, 1944.
11. *Neufeld, F. & Engwer, T.* Zur Chemotherapie der Pneumokokkeninfektionen, *Berl. Klin. Wochschr.*, **49**:2381, 1912, *cit. White, B. et als.* (24).
12. *Engwer, T.* Beitrage zur Chemo-und Serotherapie der Pneumokokkeninfektionen, *Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionkr.*, **73**:194, 1913, *cit. White, B. et als.* (24).
13. *Boehncke, K. E.* Beobachtungen bei der Chemo-Serotherapie der Penumokokkeninfektionen, *Münch. med. Wochschr.*, **50**:398, 1913, *cit. White, B. et als.* (24).
14. *Moore, H. F.* The chemo-sorotherapie of experimental pneumococcal infection, *J. Exper. Med.*, **22**:389, 1915.
15. *Boehncke, K. J.* Über die Wirkung des Camphers bei bakterieller Infektion, *Berl. Klin. Wochschr.*, **50**:818, 1913, *cit. White, B. et als.* (24).
16. *Branham, S. E. & Rosenthal, S. M.* Studies in chemotherapy. V. Sulphanilamide, serum and combined drug and serum therapy in experimental meningococcus and pneumococcus infections in mice, *Public Health Rep.*, **52**:685, 1937.

17. *Powell, H. M. & Jamieson, W. A.* Combined therapy of pneumococcic rat infections with rabbit antipneumococcic serum and sulfapyridine, *J. of Immunology*, 36:459, 1939.

18. *Colin, MacLead.* Chemotherapy of pneumococcic pneumonia, *J. Amer. Med. Assn.*, 113:1405, 1939.

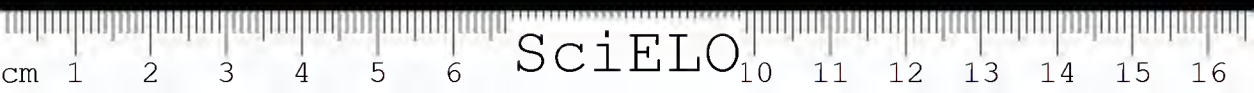
19. *Brown, T. M.* Protective action of sulfanilamide and antimeningococcus serum on meningococcus infection of mice, *Bull. Johns Hopkins Hosp.*, 61:272, 1937.

20. *Branham, S. E.* The effect of sulfapyridine and sulfanilamide with and without serum in experimental meningococcus infection, *Public Health Rep.*, 55:12, 1940.

21. *Jubb, A. A.* Chemotherapy and serotherapy in cerebrospinal (meningococcal) meningitis: an analysis of 3206 case reports, *Brit. Med. J.*, 1:501, 1943.

22. *Smith, M. I. & McClosky, W. T.* The chemotherapeutic action of streptomycin and promin in experimental tuberculosis, *Public Health Rep.*, 60:1129, 1945.

23. *Nagler, F. P. O.* Treatment of experimental gas gangrene due to *Clostridium welchii* with penicillin and antitoxin, *Brit. J. Exper. Path.*, 26:56, 1945.

24. *White, B. et als.* The biology of pneumococcus, New York, Commonwealth Fund, 1938.

A GLICEMIA NORMAL NOS OFIDIOS (*)

POR J. LEAL PRADO

(*Do Laboratório de Endocrinologia do Instituto Butantan, S. Paulo, Brasil*)

A regulação hormonal do metabolismo dos hidratos de carbono nos ofídios tem sido muito pouco estudada. Em 1933. Houssay, Biasotti & Rietti (6) mostraram que extratos de lóbo anterior de hipófises bovinas não elevavam a glicemia da boipeva *X. merremii*, ao contrário do que se observa em batráquios e mamíferos. Britton & Kline (2) assinalaram a hiperglicemia emocional em diversos vertebrados inclusive em 14 serpentes das famílias *Crotalidae*, *Boidae* e *Elapidae*. Em 1929. Luck & Keeler (7), ao estudarem a química do sangue de duas espécies de *Crotalus*, determinaram também a glicemia de um pequeno número de exemplares, encontrando-a baixa em relação à glicemia humana normal. Um estudo sistemático dos valores glicemicos normais dos ofídios, que pudesse servir de base para ulteriores investigações, não parece ter sido feito até o presente. Neste trabalho, que deverá ser o primeiro de uma série correlata, descrevo as técnicas empregadas e discuto os valores normais encontrados em parelheiras (*Philodryas* sp.) e jararacas (*Bothrops jararaca*). A parelheira foi escolhida como representante de ofídios ovíparos, não peçonhentos, da família *Colubridae*, e a jararaca, de ofídios peçonhentos, ovovivíparos, da família *Crotalidae*.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi feito em 606 serpentes adultas, de ambos os sexos, em condições aparentes de boa saúde e recebidas diretamente do serpentário dêste Instituto, sendo 44 parelheiras e 562 jararacas. A jararaca foi estudada em maior escala porque é recebida em maior número e mais regularmente. Êstes animais, uma vez no laboratório, eram colocados em gaiólas do tipo descrito por von Schuckmann (12) contendo água e alguns camundongos para eventual alimentação.

Colheita do sangue. A colheita do sangue foi feita: a) da cauda, b) da veia mandibular, c) da veia cava posterior e d) do coração. Em todos os casos

(*) Êste trabalho foi em parte subvencionado pelos Drs. A. Alves Filho e A. Ribeiro Lima, por intermédio dos Fundos Universitários de Pesquisas.

Recebido para publicação em 14 de março de 1946.

a sangria foi feita depois de repouso do animal de pelo menos 48 horas no laboratório.

a) *Da cauda*: Lavada a extremidade da cauda, corta-se com tesoura forte um segmento de 3 a 4 mm de diâmetro na superfície de corte e coloca-se o animal em posição vertical, com a cabeça para cima. O sangue goteja facilmente; desprezam-se uma a duas gotas e colhe-se o necessário. Para estancar a hemorragia, inverte-se a posição do animal, enxuga-se a superfície de corte e aplica-se cloreto férrico a ± 30%.

b) *Da veia mandibular*: A serpente é colocada dentro de um frasco presa ao gargalo pela região cervical. A mandíbula superior voltada para baixo é fixada numa placa de cortiça e a mandíbula inferior tracionada por meio de uma laçada de cordel para manter aberta a boca do animal. Punciona-se a veia com agulha fina de bisel curto.

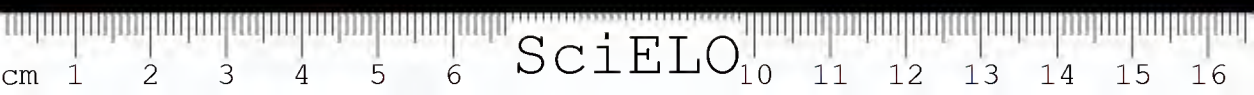
c) *Da veia cava posterior*: Por uma pequena incisão lateral, descrita por Valle (13) para a adrenalectomia na parelheira, exterioriza-se um segmento do vaso e retira-se o sangue por picada da veia.

d) *Do coração*: A localização do coração nos ofídios é muito fácil por palpação digital mas a punção ventricular nem sempre dá bons resultados. Apesar dessa via ser empregada com sucesso por outros autores, preferimos, como rotina, empregar o primeiro processo.

O sangue obtido por qualquer uma das vias mencionadas, no volume médio de 0.5 ml, (ultimamente 2 a 3 gotas por secção da cauda) era recebido em pequeno tubo de vidro limpo e sêco. Nestas condições êle só se coagula dentro de 10 minutos aproximadamente e êste tempo é mais do que suficiente para a pipetação. Somente no caso de querer usar-se o material para outras determinações era usado o oxalato de potassio, 0.2 a 0.3g%.

Para determinação da glicose foi usado o método de Hagedorn & Jensen, conforme vem descrito no livro de Peters & van Slyke (8).

RESULTADOS

Dentre as vias descritas, a mais rápida, mais simples e que permite retiradas sucessivas de sangue no mesmo animal, é a colheita pela secção da cauda. Antes de usá-la definitivamente, determinei a glicemia no mesmo animal, usando sangues colhidos quase no mesmo instante, da veia mandibular ou da cava posterior e por secção da cauda. Conforme mostra o Quadro I as diferenças médias, em 8 parelheiras e 8 jararacas foram, respectivamente, de 0.5 e 1.0 mg% de glicose. Estas pequenas diferenças, não significativas, permitem afirmar que

as determinações de glicose em sangue obtido por secção da cauda correspondem aos valores reais de glicemia. Ainda com a finalidade de explorar a precisão do método de colheita, foram feitas por êste processo retiradas repetidas de

QUADRO I

Teor de glicose no sangue obtido de um mesmo animal por corte da cauda e por punção da veia (Glicemia em mg %)

Parelheiras				Jararacas			
No.	Veia	Cauda	Difer.	No.	Veia	Cauda	Difer.
23	63	63	0	32	65	63	— 2
6	40	42	+ 2	8	36	38	+ 2
8	45	45	0	44	71	74	+ 3
28	74	75	+ 1	33	65	63	— 2
27	72	74	+ 2	52	104	107	+ 3
32	101	99	— 2	54	112	112	0
17	53	57	+ 4	56	129	127	— 2
20	62	59	— 3	57	164	170	+ 6
Média	63.8	64.2	+ 0.5	Média	93.2	94.2	+ 1.0

sangue, nos mesmos animais em horas ou em dias sucessivos. A colheita em dias sucessivos, num lote de 15 serpentes em média, dá sempre resultados constantes, apesar das variações individuais observadas. Êste tipo de experiência foi repetido suficientemente. Entretanto, si a colheita é repetida dentro de uma ou duas horas desde a primeira retirada, o resultado é bem diferente. Na primeira colheita encontra-se uma glicemia média que se pode considerar normal, mas na segunda e terceira colheitas (1 e 2 horas depois da primeira) encontra-se uma hiperglicemia nítida (Quadro II). Na segunda retirada houve um aumento médio de 31% e na terceira colheita, um aumento de 51.7% sôbre a glicemia inicial normal. Dentro de 24 horas a glicemia era novamente igual à original. De maneira que se a colheita é repetida com intervalos de 24 horas, a determinação da glicemia em sangue obtido por secção da cauda é perfeitamente aceitável.

Glicemia normal. Pelos métodos acima descritos determinei a glicemia em 562 jararacas e em 44 parelheiras. Com os valores obtidos foram construidos dois histogramas, um para as jararacas e outro para as parelheiras (Figuras 1 e 2). A média e o desvio padrão para as jararacas foram: 67.4 ± 20.5 mg% de glicose para os machos e 59.6 ± 19.0 mg% para as fêmeas. Para as parelheiras de ambos os sexos a média foi 63.3 ± 19.4 mg%.

Quadro II

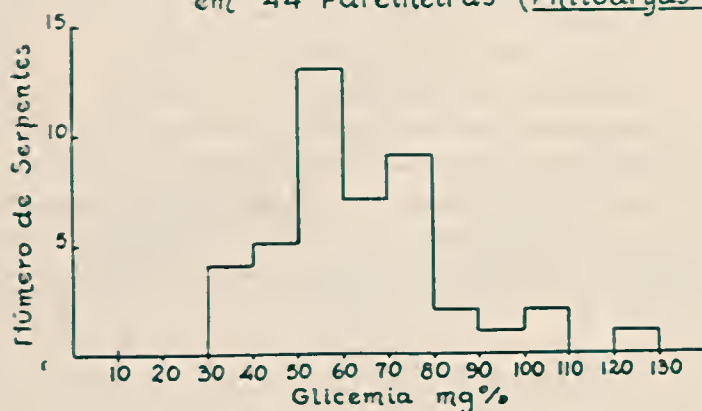
Hiperglicemia por colheitas repetidas de sangue seccionando a cauda
(Glicemia em mg %)

PARELHEIRAS

No.	Data da colheita	0 h	1 h	2 h
11	22.X.43	51	68	—
11	25.X.43	40	6[illegible]	72
9	22.X.43	43	66	—
9	25.X.43	48	62	77
9	27.X.43	58	63	69
9	29.X.43	39	48	55
14	—	55	64	—
7	25.X.43	44	51	75
7	29.X.43	41	59	73
15	25.X.43	55	78	87
15	27.X.43	33	49	53
12	25.X.43	51	69	86
12	27.X.43	58	76	87
35	—	126	122	138
22	—	69	81	91
30	—	77	95	10[illegible]
29	—	76	85	82
36	—	141	163	162
Glic. média		53	76	88
Aumento % médio			31	51.7

Fig. I

Distribuição das taxas glicêmicas normais em 562 Jararacas (Bothrops jararaca)

Fig. II

DISCUSSÃO

Glicemia e estado alimentar dos ofídios. Evidentemente a glicemia normal deveria ser determinada em período post-digestivo para evitar-se a hiperglicemia alimentar. Infelizmente, no caso da jararaca, que foi a espécie mais estudada, a alimentação espontânea em cativeiro é muito rara. Nunca se pode saber exatamente qual a duração do jejum a que o animal está submetido. Como as jararacas ficavam dois dias no laboratório antes da determinação da glicemia, êste foi seguramente, o tempo mínimo de jejum. Mas, nas nossas condições, pelo menos cêrca de 5 dias devem ter decorrido desde a última ingestão de alimento na grande maioria dos exemplares. Si bem que Benedict (1) tenha mostrado que o período digestivo nos ofídios varia segundo vários fatores, parece-me que no nosso clima um período de cinco dias aproximadamente seja suficiente para que a glicose sanguínea esteja em nível post-digestivo. Em observações ainda não terminadas, estou procurando estabelecer definitivamente

a influência da alimentação forçada — *gavage* — (Calmette, 1907) (3) na glicemia dos ofídios, já que a alimentação espontânea não se prestou à experimentação. Em algumas pareiheiras, conservadas em jejum no laboratório, desde 1 até 30 dias, pude observar que as glicemias mais altas não pertencem a cobras que jejuaram menos tempo nem as mais baixas às serpentes que jejuaram maior número de dias (Quadro III).

QUADRO III

Influência do jejum na glicemia das parelheiras

No.	Pêso g	Dias de jejum no laborat.	Glicemia mg %	No.	Pêso g	Dias de jejum no laborat.	Glicemia mg %
1	—	> 30	30	19	85	5	59
2	250	5	34	20	—	0	59
3	370	5	38	21	[illegible]	5	59
4	—	> 5	39	22	[illegible]	5	60
5	—	> 5	41	23	—	5	63
6	—	3	42	24	[illegible]	5	69
7	—	1	44	25	—	30	70
8	—	—	45	26	195	5	70
9	—	15	48	27	—	5	74
10	105	5	50	28	—	5	75
11	—	15	51	29	—	5	76
12	—	1	51	30	—	5	77
13	260	5	54	31	335	5	88
14	—	15	55	32	—	0	99
15	—	1	55	33	132	5	100
16	[illegible]	5	56	34	132	5	100
17	—	0	57	35	—	5	126
18	[illegible]	5	58	36	—	4	141

Glicemia normal. Em primeiro lugar o histograma das jararacas e o das parelheiras evidenciam a grande zona de distribuição das glicemias normais nestes ofídios; si bem que o número de parelheiras seja pequeno, parece que as distribuições são iguais nas duas espécies estudadas. A dispersão dos valores é realmente grande, pelo menos de 30 a 130 mg%. No homem, pelo método de Hagedorn & Jensen a glicemia normal varia somente de 75 a 105 mg% (Hawk & Bergeim) (5). Britton & Kline (2) em 14 serpentes recém-capturadas, encontraram também uma dispersão relativamente grande, de 54 a 109 mg%. Esta grande dispersão das taxas normais da glicose sanguínea nos ofídios é devida, na minha opinião, a uma regulação precária da glicemia. A prova de tolerância à glicose, praticada em ofídios, e que será assunto de publicação posterior, evi-

dencia a deficiência dos mecanismos reguladores da glicemia nos ofídios. Root, Hall & Gray (11) encontraram em 15 espécies de peixes uma grande variação na glicemia média, desde 5.6 até 90.7 mg% e mesmo em uma única espécie a variação individual era maior do que nos animais de sangue quente. Ao lado de observarem tal fato, relacionaram a glicemia com a atividade do peixe: os mais ativos, tinham glicemia mais elevada e os menos ativos, menor glicemia. Nos ofídios, nas duas espécies estudadas, foi também observada uma ampla distribuição das glicemias, mas não foi encontrada diferença significativa entre as glicemias da jararaca e da parelheira, esta sabidamente bem mais ativa do que aquela. Em segundo lugar, os histogramas mostram a pequena frequência de glicemias abaixo de aproximadamente 30 mg%. Isto parece indicar que em torno de 25 a 30 mg% de glicose deve estar o limite mínimo de glicemia compatível com a vida dos ofídios. Anteriormente pude mostrar que o sangue colhido por secção da cauda do ofídio fica diluido em média de 17% em relação ao sangue venoso (9). Como, apesar disto, a determinação da glicose em sangue retirado da cauda, concorda com a determinação em sangue obtido de um vaso (Quadro I) acredito que a concentração de glicose nos liquidos intersticiais da serpente deva ser igual à concentração da glicose no sangue.

Glicemia, pêso e sexo. Ao lado da determinação da glicemia, anotaram-se pêso e sexo dos animais estudados. O pêso dos machos foi de 67 a 217 g, a média sendo de 136.9 ± 24.6; nas fêmeas o pêso médio foi de 256.3 ± 98.9 havendo variação de 70 a 510 g. O estudo estatístico dos dados não revelou correlação entre pêso e glicemia. Quanto ao sexo, como já foi referido anteriormente, a glicemia média e respectivo desvio padrão das jararacas machos foram de 67.4 ± 20.5 e a das fêmeas de 59.6 ± 19.0 mg%. O test de significância das diferenças de médias ($t = 3.66$; $P < 0.001$) revelou que a diferença encontrada é significativa. Entretanto as distribuições das glicemias nos machos e nas fêmeas não são normais tanto ao test de X_2 como aos indices de assimetria e curtose. Seria curioso que nos ofídios houvesse realmente uma diferença ligada ao sexo quanto ao teor de glicose no sangue.

Glicemia e estações do ano. Si bem que a maior parte dos animais fosse capturada no verão determinei a glicemia também nos meses mais frios do ano. As médias obtidas nos meses de outubro a março, foram iguais às dos animais estudados de abril a setembro. É possível que maiores variações de temperatura do que as observadas naturalmente entre nós, influam na glicemia dos ofídios e, neste particular, já foram iniciadas as observações.

Hiperglicemia por colheitas sucessivas. A observação de que a colheita de sangue por secção da cauda provoca, por si, hiperglicemia, ficou bem assentada

(Quadro II). Esta observação foi feita em vários exemplares e verificou-se, até, a reprodutibilidade da hiperglicemia no mesmo animal, em dias diferentes. O mesmo fenômeno, si bem que menos intenso, foi observado também por colheitas sucessivas na veia mandibular de algumas parelheiras, produzindo-se um aumento de 12 a 19% sôbre a glicemia inicial. Britton & Kline (2) descreveram a hiperglicemia emocional em serpentes: a emoção produziu uma elevação de 11 a 16% na glicemia. Êstes valores de Britton & Kline são bem parecidos aos obtidos por colheitas sucessivas na veia mandibular e é bem provável que também aqui a hiperglicemia seja emocional. Na hiperglicemia por colheitas sucessivas de sangue por secção da cauda, bem mais intensa, (31 a 52%) é provável que além do fator emocional a irritação medular direta seja o principal fator hiperglicemiante. Levando também em conta que o teor de adrenalina nas adrenais de ofidios é comparável ao encontrado nos mamiferos (Valle & Porto) (14), acredito que a hiperglicemia observada em ambos os casos seja em última análise adrenalinica e a colheita sucessiva deverá ser repetida em animais adrenalectomizados para confirmação ou não da hipótese. Em trabalho a ser publicado, será mostrado que a hiperglicemia adrenalinica é fácil e rapidamente obtida em ofidios e que é de longa duração. Si bem que só se tenha verificado que a hiperglicemia por colheitas sucessivas esteja presente até 2 horas, acredito que ela perdure por várias horas antes de desaparecer completamente no fim das 24 horas.

Regulação da glicemia. Considerando a grande variabilidade da glicemia normal dos ofidios, de 30 a 130 mg%, bem como a facilidade da obtenção de hiperglicemia emocional ou de outra natureza, pensei que a regulação da glicemia nos ofidios seria precária. Posteriormente, a prova de tolerância à glicose, praticada num grande número de ofidios (Prado) (10) mostrou que, na verdade, a regulação da glicemia se faz muito lentamente nesta espécie. A fácil e rápida obtenção de hiperglicemia e a lentidão do mecanismo glicoregulador explicam, na minha opinião, as variações da glicemia encontradas num mesmo exemplar em dias diferentes; e justificam um repouso de 48 horas no laboratório para que se possa tomar a glicemia como em nivel normal. Acredito que o estudo da regulação glicêmica nos animais de sangue frio possa ser vantajoso; como bem salientaram Root, Hall & Gray (11), o metabolismo em "câmara lenta" dos animais poiquilotérmicos permite, com vantagem sôbre os animais de sangue quente, a melhor focalização de mecanismos ainda não esclarecidos

RESUMO

Como base para ulteriores investigações sôbre a regulação da glicemia nos ofídios, foi estudada a glicemia normal dêstes vertebrados, pelo método de Hagedorn-Jensen, em 562 *Bothrops jararaca* e 44 *Philodryas* sp. durante as diferentes estações do ano. O sangue foi obtido rotineiramente, por secção da cauda e, em alguns casos, por punção da veia mandibular.

A glicemia média e o desvio padrão das jararacas foram de 67.4 ± 20.5mg% para os machos e 59.6 ± 19.0 para as fêmeas. Nas parelheiras a concentração média de glicose no sangue foi de 63.3 ± 19.4 mg%. A dispersão dos valores encontrados nas duas espécies foi bastante ampla, de aproximadamente 30 a 130 mg% de glicose e em torno de 25 a 30 mg% de glicose está, provavelmente, o limite mínimo da glicemia compatível com a vida do animal.

Não foi observada variação estacional na glicemia dos ofídios.

A coleta de sangue já é por si fator hiperglicemiante. Quando se repete a secção da cauda, a glicemia se eleva de 31% na primeira hora e de 52% na segunda hora voltando ao nível inicial no fim de 24 horas. A hiperglicemia após a punção venosa é comparável em intensidade à hiperglicemia emocional dos ofídios estudada em 1939 por Britton & Kline (2).

A lenta regulação glicémica dos ofídios talvez explique a ampla dispersão dos valores registrados para as duas espécies.

ABSTRACT

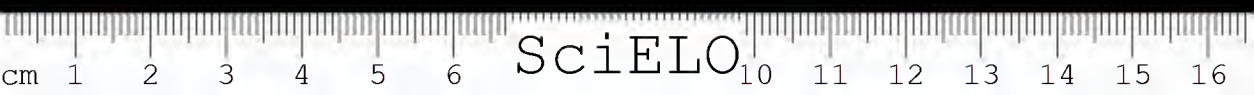
As a basis for further investigations on the control of the blood sugar in snakes, their normal glycemia was determined by the Hagedorn-Jensen method; 562 jararacas (*Bothrops jararaca*) and 44 parelheiras (*Philodryas* sp) were studied during the different seasons of the year. These snakes were maintained in special cages (von Schuckmann, 1936) and after a fasting period of about five days their blood was collected by cutting a little segment of the tail and the blood sugar determined. The results were put in graphical form (Figs. 1 and 2). The normal blood sugar concentration in jararaca was: male, 67.4 ± 20.5 mg%; female, 59.6 ± 19.0 mg%. In parelheira the glycemia was 63.3 ± 19.4 mg%. The normal ranges of blood sugar values in these two species were very large, from ca. 30 to 130 mg% and about 25 to 30 mg% is probably the minimum glycemia necessary for keeping them alive. In our climate, there was no seasonal variation in the blood sugar of Ophidia.

The glycemia of these snakes is not well regulated: there can be hyperglycemia due to emotional or other causes somewhat easely. A second or third collection of blood from the tail, within a period of 1 to 2 hrs., can induce a hyperglycemia from 31 to 52% which disappears after 24 hrs.

The large dispersion of normal glycemias in these both species can probably be explained by the slow type of blood sugar regulation in Ophidia.

Quero agradecer ao Prof. J. R. Valle as sugestões e críticas durante a execução do presente trabalho e a S. B. Henriques, a análise estatística dos resultados.

BIBLIOGRAFIA

1. *Benedict, F. G.* The physiology of large reptiles, *Carnegie Institution of Washington*, Publication No. 425, 1932.
2. *Britton, S. W. & Kline, R. F.* Emotional hyperglycemia and hyperthermia in tropical mammals and reptiles. *Amer. J. of Physiology*, **125**:730-734, 1939.
3. *Calmette, A.* Les venins, les animaux venimeux et la sérothérapie antivenimeuse, 396 pp., 125 figs., Paris, Masson et Cie., 1907.
4. *Gray, I. E. & Hall, F. G.* Blood sugar and activity in fishes with notes on the action of insulin, *Biol. Bull.*, **58**:217-223, 1930.
5. *Hawk, P. B. & Bergeim, O.* Practical Physiological Chemistry. 11th ed., Blakiston, Philadelphia, 1937.
6. *Houssay, R. A., Biasotti, A. & Rietti, C. T.* Propriedades diabetogenas del extracto antero-hipofisario en diversas condiciones, *Rev. Soc. Arg. Biol.*, **9**:489-498, 1933.
7. *Luck, J. M. & Keeler, L.* The blood chemistry of two species of rattle-snakes, *Crotalus atrox* and *Crotalus oreganus*, *J. biol. Chem.*, **82**:703-707, 1929.
8. *Peters, J P. & van Slyke, D. D.* Quantitative clinical chemistry, Baltimore, Williams & Wilkins, 1932, v. II Methods.
9. *Prado, J. L.* Hemoglobina dos ofidios. Valores normais e presença de uma forma inativa no sangue da *Bothrops jararaca*, *Mem. Inst. Butantan*, **18**:55-66, 1944/45.
10. *Prado, J. L.* A ser publicado.
11. *Root, R. W., Hall, F. G. & Gray, I. E.* The influence of insulin on glycogen distribution in marine fishes, *J. biol. Chem.*, **91**:27-35, 1931.
12. *von Schuckmann, W.* Die Haltung europäischer Giftschlangen in der Gefangenschaft und die Gewinnung ihres Giftes, *Behringwerk Mitteilungen*, **7**:75-110, 1936.
13. *Valle, J. R.* Sobrevida da parelheira (*Philodryas* sp.) depois da adrenalectomia, *Mem. Inst. Butantan*, **18**:237-240, 1944/45.
14. *Valle, J. R. & Porto, A.* A note on the adrenin content of the adrenals of snakes, *Mem. Inst. Butantan*, **18**:247-250, 1944/45.

BIOLOGICAL PROPERTIES OF ANACARDIC ACID (O-PENTADECADIENYL-SALICYLIC ACID) AND RELATED COMPOUNDS

BY F. W. EICHBAUM

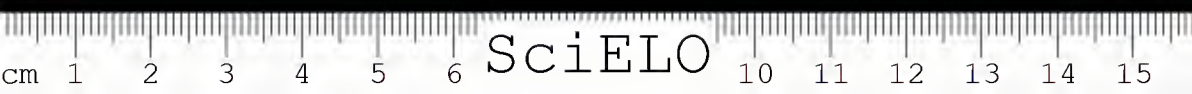
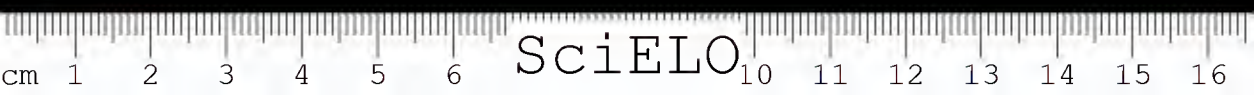
(From the Department of Microbiology of the Escola Paulista de Medicina and the Department of Immunology of the Instituto Butantan, S. Paulo, Brazil)

Part I — General discussion — Bactericidal action.

Part II — Antienzymatic and antitoxic action of anacardic acid and derivatives.

Part III — Antifebrile action of anacardic acid and related compounds.

Part IV — Vermicidal, antiprotozoic, antiectoparasitic and larvicidal action of anacardates.

Part V — Toxicology of anacardic acid and related compounds — Clinical outlook.

Mem. Inst. Butantan.
19:69-134, 1946.

BIOLOGICAL PROPERTIES OF ANACARDIC ACID (O-PENTADECADIENYL-SALICYLIC ACID) AND RELATED COMPOUNDS

BY F. W. EICHBAUM

(From the Department of Microbiology of the Escola Paulista de Medicina and the Department of Immunology of the Instituto Butantan, S. Paulo, Brazil)

PART I

GENERAL DISCUSSION — BACTERICIDAL ACTION

The isolation of antibiotic substances from molds and bacteria has also stimulated the study of higher plants in the same direction (Osborn, Lucas & Lewis). As Dubos points out, the production of these antibiotic substances is by no means an exclusive attribute of microorganisms, but is widely distributed in the animal and plant kingdoms. Until the industrial development of synthetic chemotherapeutical products, during the last decades, the plants furnished the bulk of all pharmaceutical preparations, and amongst them we find chemotherapeutically very active products such as quinine, emetine, chaulmoogra oil and others. Apart from the latter substance, whose mode of action is still under discussion, no substance with systemic antibacterial action has so far been isolated from higher plants (*). On the other hand, products with local antibacterial action, such as some ethereal oils and balms, belong to the most ancient therapeutic treasure of mankind.

In October 1943, we obtained a sample of Cashew nut oil, the fruit shell oil of the tropical tree Anacardium occidentale, in order to study its therapeutic action on spontaneous and artificial wounds in rabbits. Cashew nut oil (**) has been known for a long time as a skin irritant and vesiculant which provokes

(*) Therefore, it is misleading to call an antibacterial substance "penicillinlike", unless it displays also a definite chemotherapeutic activity cf. the Editorial in the J. Amer. Med. Ass. "Penicillinlike substances from higher plants"; in fact, not a single substance is mentioned that might claim to be really "Penicillinlike".

(**) Sometimes called also Cardol; in reality, Cardol is only one of the two main constituents of Cashew nut oil.

Received for publication in 16/2/946.

the formation of blisters, similar to those produced by cantharidin; it has been used, occasionaly, for the treatment of warts, psoriasis, eczemas and for the external treatment of leprotic lesions (Hansen & Looft: Lima; Furtado; Morais; Lacerda).

The alcoholic tincture is recommended as a vermifuge. Exact clinical observations on the therapeutic value of cashew nut oil are practically non-existent and the main significance of this product lies, to-day, in its ample technical application in the lacquer and varnish industry. The favorable therapeutical results we obtained in the treatment of infected skin wounds in rabbits, by application of a 5% ointment of Cashew nut oil, led us to test the bactericidal activity of this substance also in-vitro. It could be shown that alcoholic solutions of the oil, emulsified by slow addition of water, possessed in fact a very strong germicidal power against the common pyogenic bacteria. The next step was to isolate the two main constituents of cashew nut oil, anacardic acid and cardol (*), which were described for the first time by *Staedeler* as early as 1846; both substances proved to be about equally active with regard to their bactericidal power.

Anacardic acid (o-pentadecadienyl-salicylic acid) which makes up about 90% of the crude cashew nutshell liquid, contains a non-saturated alkyl with 15 carbon atoms linked to a salicylic acid radical.

Cardol and anacardol, which share the remaining 10%, contain the same alkyl group linked to resorcinol and phenol, respectively.

Apart from anacardic acid and Cardol (impure) the following sub-products have been studied:

Anacardol
Tetrahydro-anacardic acid
Tetrabrom-anacardic acid
Tetrachlor-anacardic acid
Isomeres of bromation on the ring of anacardic acid
Acetyl-anacardic acid (acetylester of anacardic acid)
Acetyl tetrahydro-anacardic acid
Methylether of Sodium anacardate (2 metroxy-6 pentadecadienyl-benzoic acid)
Methylether of Sodium tetrahydro-anacardate
Dimethylanacardic acid (2 metoxy-6 pentadecadienyl-methylbenzoate)

(*) The fraction called here *Cardol*, which remains dissolved in the alcoholic solution after precipitation of anacardic acid by lead hydroxide, proved in a later analysis to consist — in greater part at least — of Anacardol.

Dimethyl-tetrahydro-anacardic acid (2 metoxy-6 pentadecylmethylbenzoate)
Ethyl anacardate
Sodium anacardate
Sodium tetrahydro-anacardate
Ammonium anacardate
Copper anacardate
Silver anacardate
Copulation product of anacardic acid and sulfanilamide

(cf. Table No. V)

(pag. 89/90)

The alkali salts of anacardic acid can be classified amongst the anionic detergents. Substances of this group have been synthetized recently on a very large scale (*); apart from their technical usefulness they possess a well defined germicidal power, which is directd mainly against gram-positive germs.

The special interest we attribute to anacardic acid and its subproducts seems justified by the fact that these easily obtainable substances of vegetal origin display some qualitative and quantitative features that distinguish them from most other anionic detergents.

The alkali salts of anacardic acid belong to the most potent anionic detergents; they possess, in particular, a staphylococcidal activity equalled by few others. Their bactericidal activity is not only limited to gram-positive germs, but includes also gram-negative genera such as Neisseria, Brucella, Pasteurella, Hemophilus and amongst the Enterobacteriaceae, the proteus bacilli. Their activity is practically independent of the actual pH of the medium. The alkali salts possess good solubility in lipid solvents and fair solubility in water; consequently, their germicidal activity becomes patent in watery as well as in oily solutions, although to a lesser degree in the latter. Finally, anacardic acid possesses an antipyretic activity, probably due to its salicylic nucleus, and a vermicidal action, both phenomena so far unknown in other detergents.

The study of anacardic acid and related products has been extended to the following problems:

1. germicidal action
2. detoxifying action
3. antienzymatic action
4. anthelmintic action
5. anti-ectoparasitic action

(*) Among the synthetic anionic detergents, alkyl compounds with 15 C atoms are to be found only exceptionally.

6. larvicidal action
7. antiprotozoic action
8. antifebrile action
9. toxic action
10. clinical application.

GERMICIDAL ACTION

Methods — The antibacterial power of anacardic acid against various bacteria can be checked grossly by measuring the diameter of the germfree zone, formed round a central hole in an agar dish which is filled with a 1% Na anac (*) solution (cf. photo No. I and II).

Alternatively, another technique, as advocated by Flemming, gives a still better impression of the relative sensitiveness of various germs towards Na anac: The method consists in cutting out a strip of agar from a culture plate and planting various bacteria in streeks at right angles to the gutter thus formed; the gutter has been previously filled with a mixture of equal parts of liquefied agar and a 1% Na anac solution. The active substance thus diffuses into the agar and inhibits the growth of bacteria for a distance varying with their sensitivity to Na anac. When testing for gonococci and other delicate germs, the agar is prepared with 1/4 — 1/3 part of ascitic fluid or serum.

Special care should be taken that the quantity of the planted germs is approximately equal for all tested samples, since the size of the sterile zone depends to a certain degree on the density of the inoculum.

Results — Graph No. I, which condenses a great number of tests, illustrates this type of experiment, showing the absolute resistance of the Entereobacteriaceae, the relative sensitivity of Brucellae, Neisseriae, Pasteurellae and of various gram-positive bacteria.

GRAPH No. 1

(*) "Na anac.", in the following is used as an abreviation for Sodium anacardate.

6

This type of experiment, however, does not allow any conclusion as to whether the absence of bacterial growth is due to a bactericidal or a bacteriostatic process. We tried to settle this issue by comparing the antibacterial activity of various Na anac. dilutions in two parallel series. In the first series the agar was mixed with various Na anac. concentrations and, after solidification, inoculated with a given amount of staphylococci (bacteriostatic test: Table Ia). In the second series a suspension of staphylococci was incubated for 15' (at room temperature) with varying concentrations of Na anac. and was afterwards transfered to a Petri dish and mixed with liquefied agar (bactericidal test: Table Ib).

TABLE No. IA AND IB

Ia. Bacteriostasis

To each Petri dish (containing 20 cc agar and 0.1 cc of the various dilutions of Na anac.) 0.1 cc of bacterial suspension (staphylococci) is added.

Initial dilution of Na anac.	Na anac. Amount per Agar dish	Na anac. Amount per 1 cc agar	No. of germs per cc after 24 hours' incubation	Degree of activity
1) 1/100	1 mg	50 γ	0	+++
2) 1/1000	100 γ	5 γ	33,000	±
3) 1/10000	10 γ	0.5 γ	150,000	—
4) 1/100000	1 γ	0.05 γ	150,000	—
5) 1/1000000 ...	0.1 γ	0.005 γ	150,000	—
6) Saline control	—	—	150,000	—

Ib. Bactericidia

1 cc of various dilutions of Na anac. is mixed with 1 cc of bacterial suspension (Staphylococci); after 15' contact, 0.2 cc are transfered into 20 cc agar.

Initial dilution of Na anac.	Amount of Na anac. per 1 cc mixture Na anac. + bacteria	Total amount of Na anac. per agar dish	Na anac.: Amount per 1 cc agar	No. of germs per cc after 24 hours' incubation	Degree of activity
1) 1/100	5 mg	1 mg	50 γ	0	+++
2) 1/1000	500 γ	100 γ	5 γ	0	+++
3) 1/10000	50 γ	10 γ	0.5 γ	0	+++
4) 1/100000	5 γ	1 γ	0.05 γ	925	+
5) 1/1000000 ..	0.5 γ	0.1 γ	0.005 γ	150,000	—
6) Saline control	—	—	—	150,000	—

Conclusion — Table Ia shows, that the limit of "bacteriostasis" lies at a concentration of 5γ/cc agar. In Table Ib., reduced growth is to be observed up to the fourth agar dish, which corresponds to a final Na anac concentration of 0.05γ/cc agar. Since this concentration, according to Table Ia., is inactive, the reduced growth in the fourth dish (Table Ib.) cannot be due to a bacteriostatic action; it was the 15 minutes' contact of 5γ Na anac that killed the greater part of the cocci — and this corresponds exactly to the value also found to be active in Table Ia. It follows, therefore, that the antibacterial activity of Na anac is not a bacteriostatic but a bactericidal one (*). This was also corroborated by experiments on animals: highly virulent hemolytic streptococci were brought in contact, during 15', with varying amounts of a Na anac solution (dilution 1/200 — 1/200000) and afterwards injected, by intraperitoneal route, into mice: the animals injected with 0.5 cc of each "mixture" survived, whereas the control died 24 — 48 hours after the inoculation.

No chemotherapeutic action of Na anacardate and related products (cf. Table No. V) on streptococci, pneumococci and anthrax bacilli could be observed. Neither did the intraperitoneal injection of Na anac solutions, 5 — 10' following an intraperitoneal injection of streptococci, prevent deadly bacteremia. (**)

In order to measure the sensitiveness of various germs towards Na anac by a more accurate method, the different bacterial species were tested in a "bactericidal" experiment:

A series of seven tubes was set up, each containing 1 cc of the bacterial suspension in test; the number of germs per cc amounted, on the average, to 200000 — 400000/cc; in a few instances smaller inocula (1000000 germs per cc or denser inocula (200000 germs per cc) were used. Falling concentrations of Na anac (1/1000 — 1/10000000) in a 1 cc volume were added to subsequent tubes; the last (control) tube was completed with physiological saline solution. The final dilutions of Na anac were consequently 1/200; 1/2000; 1/20000 etc.

After 15' exposure to room temperature, 0.1cc was drawn from each tube and put into a Petri dish and mixed immediately with liquefied agar. Another

---

(*) In the same direction lie also the results obtained by varying the time of contact between anacardate and bacteria. The following table shows the number of living germs in a suspension of 200000 staphylococci per cc mixed with equal parts of a 1/100000 Na anac. solution, after varying periods of contact.

	time of contact	No. of germs
	5' - 10'	5000/cc
	15'	450/cc
	30'	10/cc
	60'	0
Control	60'	100000/cc

(**) Experiments on mice.

Action of Na anacardate on Actinomyces (the hole in the centre of the agar dish contains 0.2 cc of the Na anacardate solutions).

PHOTOGRAPH I
Activity of a 1/100 Na anacardate solution.

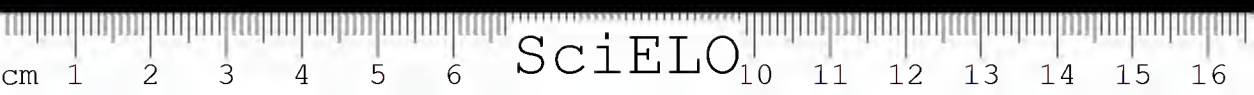
PHOTOGRAPH II
Activity of a 1/10000 Na anacardate solution.

0.1cc from each tube was transferred into 5 cc of glucose broth. After a 48 hours' incubation at 37°, readings were made both from agar and broth (*). In doubtful cases, a subculture was made from the glucose broth. The inoculation in broth proved to be, in general, more sensitive than the inoculation in agar. All tests were performed in duplicate, triplicate, or even more frequently.

TABLE No. II

Bactericidal power of sodium anacardate against various bacteria after 15' contact at room temperature

Concentration of Na anacardate

	1/200	1/2,000	1/20,000	1/200,000	1/2,000,000	1/20,000,000
Neisseria gonorrhoeae . . .	0	0	0	+	+++	+++
Staphylococcus haemol. aur.	0	0	0	0 · +	+++	+++
Streptococ. pyogenes	0	0	0	0	± · +	+++
Bac. anthracis	0	0	0	± · +	+++	+++
Brucella melitensis	0	0	+	+++	+++	+++
Pasteurella aviseptica . .	0	0	±	+++	+++	+++
Mycobact. tuberculosis (human strain "Ratti") ..	0	0	0	+	+++	+++
Escherichia coli	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Salmonella paratyphi B. (Schottmueller)	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Salmonella typhi	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Salmonella paratyphi B. (Breslau)	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Bac. pyocyaneus	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Bac. proteus (X 19)	0	±	+++	+++	+++	+++
Penicil. notatum	0	±	+++	+++	+++	+++
Aspergil. niger	++	+++	+++	+++	+++	+++
Yeast (strain isolated from the air)	±	+++	+++	+++	+++	+++

Readings: 0 no growth; ± isolated colonies; + weak growth; ++ medium growth; +++ full growth (equal to saline control).

(*) The growth of the tubercle bacilli cultures (in Sauton's medium) was checked after a 4 weeks' incubation at 37°.

With the exception of proteus bacilli and tubercle bacilli, which showed a different sensitiveness of various strains, the members of the other tested genera did not reveal any remarkable differences as to their sensitivity towards Na anac.

Conclusion — The foregoing Table II shows the high sensitiveness of all gram-positive bacteria toward Na anac, highest for streptococci, weaker for gram-negative genera such as Neisseria, Brucella, Pasteurella, and complete insensitiveness of the Enterobacteriaceae (except for the slightly sensitive proteus bacilli) as well as of the bac. pyocyaneus.

A suspension containing 600000 typhoid bacilli per cc, mixed with 1 cc of a 1/100 Na anac solution, became sterile only ofter 48 hours' contact. (The number of germs in the NaCl control had dropped, during the same time, to 100000 germs/cc); paratyphoid B bacilli behaved in the same way, whereas Shiga bacilli and coli bacilli survived more than 72 hours under the same conditions.

The behaviour of proteus bacilli varies according to the strain chosen. A 20 minutes' contact with a 1/100 Na anac solution kills practically all strains; a 1/1000 solution kills some strains; others suvive, but when subcultured in agar, generally only the 0 forms will develop; 2 cc of a 1/100 Na anac solution added to 20 cc agar in a Petri dish either inhibit the growth of proteus bacilli entirely, or make them grow in the O form, according to the sensitivity of the respective strains.

This observation agrees with the findings of Lominsky and Lendrum, who tested anionic, cationic and undissociable detergents as to their "antiswarming" activity; among 54 tested products, 42 proved to be active, some of them even in very high dilutions. There was a certain relation between surface activity and antiswarming power.

When a mixture of proteus bacilli (H X 19) and typhoid bacilli (Ty 2) is exposed for 15' at room temperature to the action of a 1/200 Na anac solution, the subculture gives only growth of typhoid bacilli in Agar and Teagues medium. As the same substance suppresses the growth of all gram-positive germs, it might serve as a useful device for the isolation of the Enterobacteriaceae. In order to eliminate with certainty even the more resistant proteus strains, the contact with the Na anac solution might be prolonged to 30 or even 60 minutes without impairing the viability of the other Enterobacteriaceae.

The critical bactericidal concentration of Na anac for tubercle bacilli lies at 5γ/cc, which kills the tubercle bacilli after a 30 minutes' contact; after a 15' contact the destruction is incomplete.

In his studies on the antibacterial action of Sodium ricinoleate (which we found about ten times weaker than Na anac) Larson obtained different results when inoculating solid or liquid media, a phenomenon he relates to the changed surface tension in the liquid media. Our experiments with anacardates in the same direction have not yet been performed on a sufficient scale to permit a definite conclusion. In liquid media we did not observe, either with Na anac or with ricinoleate, a submerged growth of the tubercle bacilli as described by Larson *et al.* It cannot be decided, for the moment, whether these contradictory results depend only on the strains used for the respective experiments.

The inoculation of a suspension of bovine tubercle bacilli (Vallée) which had remained in contact with a 1% Na anac solution for 15, 30 and 60 minutes respectively, did not produce tuberculosis in guinea pigs after 4 months of observation. In the same period, 3 out of 4 control animals showed a progressive tuberculosis, the fourth animal only a local process at the inoculated site.

The vegetative forms of anaerobic bacteria (Cl. tetani, Cl. perfringens, Cl. septicum) are readily killed even by high dilutions of Na anac; the spores of Cl. tetani and Cl. septicum survive even a prolonged contact (1 hour) with a 1/100 Na anac solution, whereas the spores of Cl. perfringens and aerobic bacilli (anthrax, subtilis) are very sensitive.

Molds and yeasts, with few exceptions, are very resistant. Penicillium notatum is only very slightly inhibited in an agar dish containing Na anac (cf. technique page 74).

The Spirochaeta gallinarum is highly sensitive to the action of Na anac: a 1/2000 dilution, mixed with equal parts of infected blood, immediately immobilizes the spirochaetes, in spite of the presence of proteic substances, which commonly reduce the antibacterial activity to a great extent. An anti-Flexner bacteriophage was not inactivated by a 2 hours' contact with a 1/1000 Na anac solution.

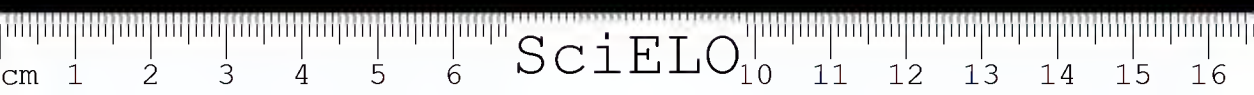
The sensitivity of motile bacteria to anacardic acid and derivatives, at various concentrations, can be rapidly tested by the hanging-drop method. The motility test gives results which practically parallel the bactericidal test. (Table III).

Motility test of B. proteus X19, Bac. subtilis, Salmonella Breslau

(in contact with different concentrations of Na anac. — Hanging drop method)

TABLE No. III

Concentration of Na anac.		Time of contact								
		0'	5'	10'	15'	20'	25'	30'	60'	120'
B. proteus II X 19	1/200	+	±	0	0	0	0	0	0	0
	1/2000	+	+	+	+	±	0	0	0	0
	1/20000	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Physiol. NaCl	+	+	+	+	+	+	—	+	+
Bac. subtilis	1/200	±	0	0	0	0	0	0	0	0
	1/2000	+	±	0	0	0	0	0	0	0
	1/20000	+	+	+	±	0	0	0	0	0
	Physiol. NaCl	+	—	+	+	+	+	+	+	+
Salmonella Breslau	1/200	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	1/2000	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	1/20000	+	+	+	—	+	+	+	+	+
	Physiol. NaCl	+	+	+	—	+	+	—	+	+

Readings: motile +
only few germs / weakly motile } ±
immobile 0

Cultures made after the same intervals gave the following result:

Time of contact

	0'	15'	30'	40'	60'
B. proteus H X 19 — Na anac. 1/200 ...	4 colonies (0-form)	ø	7 colonies (0-form)	ø	ø
Na anac. 1/2000 ...	9 colonies (0-form)	2 colonies (0-form)	ø	ø	ø
Na anac. 1/20000 ...	"H" growth	"H" growth	"H" growth	"H" growth	"H" growth
NaCl control (*) ...	"H" growth	"H" growth	"H" growth	"H" growth	"H" growth
B. subtilis — Na anac. 1/200	ø	ø	ø	ø	ø
Na anac. 1/2000 ...	1% of the control	ø	ø	ø	ø
Na anac. 1/20000 ..	15% of the control	ø	ø	ø	ø
NaCl control (*) ...	100%	100%	100%	100%	100%
Salmonella Breslau — Na anac. 1/200 ... / 1/20000 .	100% of the control				
NaCl control (*) ...	100%	100%	100%	100%	100%

Sterility = ø
(*) Number of germs approximately 300000 cc.

Influence of pH on the bactericidal activity of Na anac.

It has been shown that the bactericidal activity of anionic and cationic detergents is greatly influenced by the actual pH — the anionic detergents being most active at an acid, the cationic at an alkaline pH (Baker, Harrison and Miller). When testing the bactericidal activity of anacardic acid against staphylococci and anthrax bacilli at various pH steps, we were surprised to discover that the actual pH had apparently no influence on the bactericidal activity of anacardic acid (cf. Table IV).

Table No. IV

Influence of pH on the bactericidal effect of sodium anacardate at various concentrations

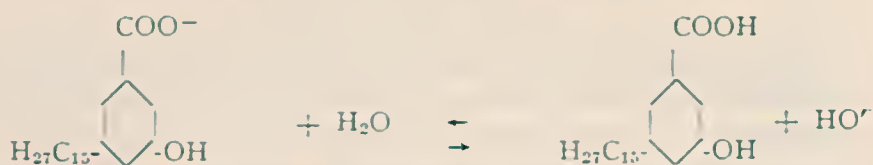
(The technique of this experiment corresponds to the "bactericidal experiment" in Table Ib.)

Tube No.	Buffer solution pH	Sodium anacardate 1/10000	Suspension of Staphylococci		No. of germs per 1 cc	
1	3.6 1 cc	1 cc	1 cc	15' minutes' contact at room temperature. Transference of 0.1 cc from each tube into a Petri dish, mixing immediately with melted agar. Incubation for 48 hours at 37°. Readings after 48 hours incubation.	0	The Buffer solutions pH 3.6; 4 and 5 were made up with an acetic acid — sodium acetate mixture, the buffer solutions pH 6 — pH 9 with a mono-potassium phosphate — Borax mixture. (cf. T. W. Kolthoff, "Säurebasen Indicatoren", Berlin. 1932, pp. 257/258).
2	4 1 cc	1 cc	1 cc		0	
3	5 1 cc	1 cc	1 cc		0	
4	6 1 cc	1 cc	1 cc		0	
5	7 1 cc	1 cc	1 cc		0	
6	8 1 cc	1 cc	1 cc		0	
7	9 1 cc	1 cc	1 cc		0	
		Sodium anacardate 1/100000				
8	3.6 1 cc	1 cc	1 cc		0	
9	4 1 cc	1 cc	1 cc		0	
10	5 1 cc	1 cc	1 cc		0	
11	6 1 cc	1 cc	1 cc		500	
12	7 1 cc	1 cc	1 cc		20	
13	8 1 cc	1 cc	1 cc		0	
14	9 1 cc	1 cc	1 cc		20	
		Sodium anacardate 1/1000000				
15	3.6 1 cc	1 cc	1 cc		0	
16	4 1 cc	1 cc	1 cc		8,000	
17	5 1 cc	1 cc	1 cc		200,000	
18	6 1 cc	1 cc	1 cc		210,000	
19	7 1 cc	1 cc	1 cc		280,000	
20	8 1 cc	1 cc	1 cc		270,000	
21	9 1 cc	1 cc	1 cc		220,000	
		Physiol. saline solution				
22	3.6 1 cc	1 cc	1 cc		0	
23	4 1 cc	1 cc	1 cc		7,000	
24	5 1 cc	1 cc	1 cc		210,000	
25	6 1 cc	1 cc	1 cc		200,000	
26	7 1 cc	1 cc	1 cc		230,000	
27	8 1 cc	1 cc	1 cc		200,000	
28	9 1 cc	1 cc	1 cc		240,000	

Result — The limit of the bactericidal activity lies for all pH steps at 1/100000 (or according to the final dilution of the anacardate at 1/300000); the stronger pH concentrations 3,6 and 4, cannot be taken into account, as they themselves kill the exposed germs (cf. control tube 22 and 23). At a 1/3000000 concentration the anacardate is inactive at all pH steps (*).

The lack of influence of the pH concentration on the bactericidal activity of anacardic acid places this substance apart from other anionic detergents, with whom it otherwise shows great similarity of action.

As we have pointed out elsewhere (Eichbaum, Hauptmann and Rothschild) this unusual behaviour of anacardic acid might be explained by the fact that the hydrolytic dissociation of anacardic acid seems to follow the scheme

$$H_{27}C_{15}\text{-}C_6H_3(COO^-)\text{-}OH + H_2O \rightleftarrows H_{27}C_{15}\text{-}C_6H_3(COOH)\text{-}OH + HO'$$

This means that even in (weakly) alkaline solutions, undissociated anacardic acid is present, which is responsible for the bactericidal action. According to Osterhout, the undissociated molecules possess a greater ability to enter the cell and are therefore more active than the ionized componnds.

Inhibiting factors

Both serum and lecithin have an inhibiting effect on the bactericidal activity of Na anac, as has been observed also with other anionic detergents. The germicidal power of Na anac and related products, in the presence of approximately 25% of serum, is reduced to 1/100 — 1/500 part of the activity in saline medium. The formation of insoluble Calcium salts cannot be responsible for this phenomenon, since the addition even of an excess of Sodium citrate does nos modify the result.

The inhibiting effect of two commercial egg lecithin preparations ("P and E") differed considerably, although both samples were marked as "pure".

0.5 cc of a 1/1000 dilution of lecithin "E" neutralized completely the staphylococcidal activity of 0.5 cc of a 1/10000 Na anac. solution, whereas the inhibition caused by lecithin "P" under the same condition was only partial (**).

(*) The test with anthrax bacilli gave in general the same result as the test with staphylococci.

(**) The lecithin emulsions were prepared from a 1% stock sol. in alcohol, by adding physiol. saline solution. A control test with the same amount of alcohol as contained in the 1/1000 lecithin-emulsion did not show any interference with the bactericidal activity of Na anac.

An analogous result was obtained, using instead of egg lecithin, autolysates of gram-positive germs (Staphylococci) or gram-negative bacteria (coli bacilli).

The inhibiting action of lecithin can also be easily demonstrated by the hanging drop method. Motile gram-positive bacilli, suspended in lecithin + an otherwise imobilizing concentration of Na anac, remain motile for many hours.

Pus, from an acute phlegmone, containing numerous leucocytes and staphylococci, did not diminish appreciably the sterilizing power of a 1/200 solution of Na anac.

Relation between chemical structure and antibacterial activity

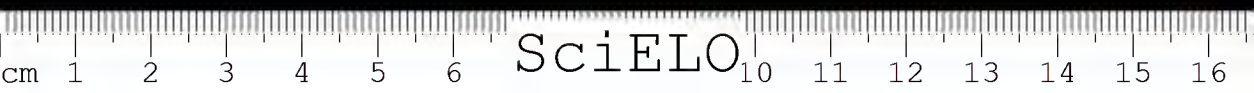
(cf. Table No. V) (*)

Various structural factors seem to influence the bactericidal activity of anacardic acid.

Salicylic acid, which possesses the same aromatic nucleus, with the carboxyl and the hydroxyl groups in identical positions as anacardic acid, but no alkyl radical, is devoid of the specific activity of anacardic acid. Linoleic and ricinoleic acid, that are similar to anacardic acid in the structure of the side chain, but which do not contain the aromatic nucleus, display a similar activity, though to a definitely lesser degree. *It can be concluded therefrom that coexistence of an aromatic nucleus and a long aliphatic side-chain is indispensable for the high bactericidal activity of anacardic acid.*

The saturation of the side-chain does not seem to be of special significance, since the tetrahydro-anarcadic acid and its sodium salt possess only a slightly lower activity than the unsaturated compounds.

There exists, however, one striking difference between the saturated and the unsaturated compounds, which we are at a loss to explain satisfactorily. Whereas anacardic acid and sodium anacardate display full activity in liquid as well as in solid media, the saturated products act only in liquid media. Even crystalline sodium tetrahydro-anacardate, when placed in the centre of an inoculated agar dish, does not prevent the growth of staphylococci up to the very border of the substance. This cannot be due only to a low diffusion of this substance: Crystalline Na tetrahydro-anacardate was placed in the centre of a sterile agar dish and allowed to diffuse into the surroundig gel during 24 hours at 37°: only after this interval the whole agar dish was inoculated with a suspension of staphylococci. Even then, not the slightest inhibition of bacterial growth could be noticed. In striking contrast to this observation is the fact that this subs-

(*) Cf. F. Eichbaum, H. Hauptmann, H. Rothschild, l.c.

tance, in watery solution, has about the same high bactericidal titre as the unsaturated analogon.

In order to analyse the special importance of the free hydroxyl group in the aromatic nucleus, we tested the derivatives, in which the hydrogen of these groups was substituted.

Three types of compounds are possible: one, in which the hydrogen of the phenolic hydroxyl was substituted (methylether of anacardiac acid = 2 metoxy — 6 pentadecadienyl benzoic acid); a second, in which the hydrogen of the carboxyl group was substituted (ethyl anacardate); a third, in which both hydroxyls were substituted (2 metoxy — 2 — pentadecadienyl methylbenzoate).

The comparison of the bactericidal activity of the various substances enumerated in Table No. V shows that the etherification of the phenolic hydroxyl-group has little influence on the activity, since the sodium salt of the methylether owns a bactericidal power only slightly inferior to anacardic acid. Neither does the esterification of the carboxylgroup lead to a complete extinction of the germicidal activity. On the other hand, the simultaneous substitution of both hydrogens renders the compounds almost inactive. Corresponding results have been obtained with tetrahydro-anacardic acid, although the methylation of the phenolic hydroxyl group seems to diminish much more the activity of this substance than is the case with the non-hydrogenated acid.

The inactivation of anacardic acid by introduction of two methyl groups into the phenol and carboxyl group, respectively, is not restricted to the bactericidal activity alone. As will be shown later, anacardic acid inhibits also the plasma coagulating activity of certain snake venoms; the same holds true for tetrahydroanacardic acid, whereas the dimethyl-products are devoid of any toxin destroying activity.

All these products show, apart from quantitative differences, the same specificity of their antibacterial power, which is directed principally against gram positive germs; in all instances, the bactericidal activity was reduced in the presence of either serum or lecithin.

Three more products, not included in table N° V should be mentioned here.

1. An addition-product of sodium anacardate and sulfanilamide, which showed exclusively the characteristics of the anionic detergent and whose action in-vitro, was not inhibited by p-amino-benzoic acid. The product did not reveal any chemotherapeutic activity against a virulent strain of hemolytic streptococci (*).

(*) Experiments on mice.

2. Copperanacardate (*). The recently prepared substance is highly soluble in lipoid solvents (ether, acetone, petrolether, chloroform). The aged salts, even a few hours after the preparation, become absolutely insoluble in either water or lipoid solvents. An emulsion prepared from the acetone solution showed a high bactericidal power against both gram-positive and gram-negative germs, the latter activity being probably due to the dissociation of oligodynamically active copper ions. The bactericidal power against the gram-positive germs was stronger than against the gram-negative ones; this shows that the antibacterial activity is not due only to the presence of Copper ions, which act mainly on the gram-negative bacteria (Neisser and Eichbaum). The growth of molds was not inhibited by Copperanacardate.

3. Silveranacardate, (*) which is soluble only as a complex in ammonia, shows, like the coppersalt, a high activity against both gram-postive and gram-negative bacteria. In part, this activity might be due to the high alkalinity of the substance.

TABLE No. V

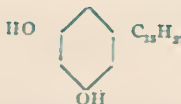
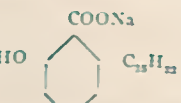
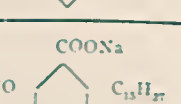
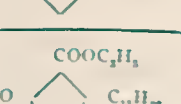
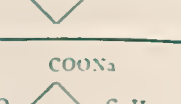
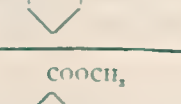
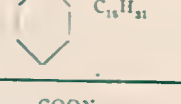
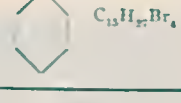
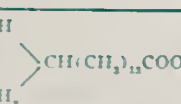
(pag. 89/90)

Bactericidal action of anacardic acid and related compounds (**) against Staphylococcus haemolyticus aureus.

Technique — Each substance (No. 1-20) was tested in 5 progressive dilutions (1:100—1:1,000,000) which were made up with physiologic saline. 1 cc of each dilution remained in contact with 1 cc of a staphylococcal suspension, for 15' at room temperature.

Then 0.1 cc was withdrawn from each tube and tranferred to a Petri dish where it was mixed immediately with liquefied agar (40°). The solidified agar dishes were placed into the incubator at 37°; after 48 hours the grown colonies were counted and the results were registered, as follows:

O sterility
\+ weak growth
++ medium growth
+++ full growth (equal to the control)

Each series of tested substances included one control tube, which contained 1 cc of saline solution + 1 cc of staphylococcal suspension.

(*) Details on the interesting physico-chemical properties of these substances will be described elsewhere by H. Hauptmann and H. Rothschild.

(**) The "Cardol" mentioned in the following table was obtainable only in an impure form and contained certainly still a high percentage of anacardol.

Bactericidal action of anacardic acid and related compounds against Staphylococcus haemolyticus aureus.

TABLE No. V

No.	Substance	Formula	DILUTIONS $5x10^{-3}$	$5x10^{-4}$	$5x10^{-5}$	$5x10^{-6}$	$5x10^{-7}$	Control in saline	Type of solution
1	Crude Cashew oil	—	0	0	0	+ · ++	+++	+++	emulsion in alcohol-water
2	Cardol	HO (ring) $C_{15}H_{27}$; OH	0	0	+	++	+++	+++	idem
3	Anacardol	HO (ring) $C_{15}H_{27}$	0	0	0	+	+++	+++	idem or emulsion with gum arabic
4	Anacardic acid	COOH; HO (ring) $C_{15}H_{27}$	0	0	0	+	++ · +++	+++	like No. 3
5	Sodium anacardate	COONa; HO (ring) $C_{15}H_{22}$	0	0	0	0 · +	++ · +++	+++	solution in water
6	Ammonium anacardate	$COONH_4$; HO (ring) $C_{15}H_{27}$	0	0	0	0 · +	++ · ++	+++	idem
7	Tetrahydro-anacardic acid	COOH; HO (ring) $C_{15}H_{31}$	0	0	0 · +	+ · ++	+++	+++	emulsion with gum arabic
8	Sodium tetrahydro-anacardate	COONa; HO (ring) $C_{15}H_{27}$	0	0	0	+	+++	+++	solution in water
9	Ethylanacardate (Ethylester of anacardic acid)	$COOC_2H_5$; HO (ring) $C_{15}H_{27}$	0	0	+	+++	+++	+++	emulsion with gum arabic
10	Sodium methyl-anacardate (Methylether of Na anacard.)	COONa; H_3CO (ring) $C_{15}H_{27}$	0	0	0	+	++ · +++	+++	solution in water
11	Sodium methyl-tetrahydro-anadate (Dimethylanacardic acid)	$COOCH_3$; H_3CO (ring) $C_{15}H_{31}$	+	++	+++	+++	+++	+++	emulsion with gum arabic
12	Sodium methyl tetrahydro-anacardate (Methylether of Na tetrahydro anac.)	$COOCH_3$; H_3CO (ring) $C_{15}H_{31}$	+	++	++ · +++	+++	+++	+++	idem
13	Methylether of methyltetrahydro-anacardate (Dimethyltetrahydro-anacardate)	$COOCH_3$; H_3CO (ring) $C_{15}H_{31}$	++ · +++	++ · +++	+++	+++	+++	+++	idem
14	Sodium tetrabrom-anacardate	COONa; HO (ring) $C_{15}H_{27}Br_4$	0	0	+	++	+++	+++	idem
15	Sodium tetrachlor-anacardate	COONa; HO (ring) $C_{15}H_{27}Cl_4$	0	0	0	++	+++	+++	emulsion with gum arabic
16	Sodium linoleate	$C_{17}H_{31}COONa$	0	+ · ++	++ · +++	+++	+++	+++	solution in water
17	Sodium ricinoleate	$C_{17}H_{32}OCOONa$	0	+	+++	+++	+++	+++	idem
18	Sodium oleate	$C_{17}H_{33}OCOONa$	++	++ · +++	+++	+++	+++	+++	idem
19	Sodium chaulmoograte	CH = CH / $CH_2 - CH_2$ > $CH(CH_2)_{12}COONa$	++ · +++	+++	+++	+++	+++	+++	idem
20	Sodium salicylate	COONa; HO (ring)	+++	+++	+++	+++	+++	+++	idem

Readings: 0 no growth; + weak growth; ++ medium growth; +++ full growth.

The test strain, used in these experiments, was an hemolytic coagulase-positive staphylococcus (aureus) which had been isolated recently from an abscess (Strain G 7 of our collection). The average number of staphylococci in the "suspension" amounted to 200000 germs per 1 cc).

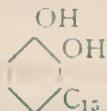
Discussion — The alkali salts of anacardic acid can be classified as anionic detergents since they possess the characteristic hydrophobe and hydrophile groups, the active part being located in the anionic complex. Accordingly, they show the characteristics common to all anionic detergents (**) : high surface activity, emulsifying power, bactericidal activity directed especiallà against gram-positive germs, toxin-destroying activity, specific inhibition by phospholipids. It is interesting to note that other surface-active agents with high bactericidal activity like gramicidin and certain toxic wheat proteins are equally inactivated in the presence of phospholipids (Dubos). Dubos holds that the phospholipids exert a "protective action on the cell surface, perhaps at the very sites where the toxic agent would otherwise become absorbed." The same phenomenon takes place, however, in a cell free medium as well: the toxin-destroying action of anacardic acid, ricinoleate and other detergents is specifically inhibited by lecithin, and *this only when toxin and lecithin are exposed simultaneously to the action of the detergent, or if lecithin and the detergent are mixed together and the toxin is added afterwards. If, however, toxin and detergent are mixed together and lecithin is added shortly afterwards, the atoxic complex (toxin-detergent) is not dissociated* (***). This speaks, in our opinion, in favor of a physico-chemical union between lecithin and the detergent, without the interference of an absorbing cellreceptor.

The resistance of gram-negative bacteria against gramicidin, etc. can be explained, after Dubos, in a similar way, "as these microorganisms produce certain metabolic products, rich in phospholipids, which behaved as extremely active inhibitors of gramicidin. In mixed cultures of gram-positive and gram-negative bacilli, the latter suppressed the action of gramicidin on the otherwise very sensitive microorganisms." The anacardates, which have chemically no relation to the polypeptide gramicidin, behave in a different way, since their activity on gram-positive germs remains unimpaired even in the presence of great amounts of gram-negative bacteria. Autolysates of dense bacterial suspensions of either gram-positive (staphylococci) or gram negative-bacteria (B. coli) are of equal potency as to their inhibiting power on the bactericidal action of the anacardates.

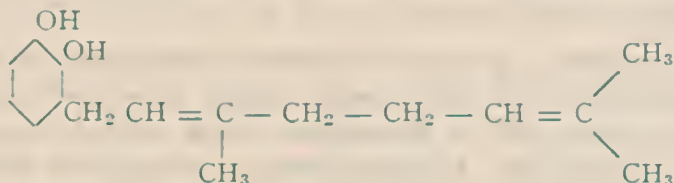
(**) Among the anionic detergents derived from straight chain alkyl compounds, those with 12-16 C atoms in the aliphatic chain proved to be most active (Baker, Harrison, Miller).

(***) Further details cf. the next paper.

Numerous plants, belonging to various families, produce substances with a structure similar to anacardic acid and cardol. From a medical point of view, the most important among them is urushiol ("poison ivy" from Rhus toxico-

OH
OH

dendron) $C_{15}H_{27}$, the substance responsible for many cases of toxic dermatitis. A similar skin-irritating effect has been observed with Bhilawanol (from Semicarpus anacardium), which is chemically identical with urushiol (Goldsmith). To our knowledge, bactericidal and other biological tests with Urushiol, Bhilawanol, etc., have not been performed so far, though the resemblance of these substances to anacardic acid and cardol, would suggest a similar biological activity. Keil and others found in persons sensitive to poison ivy a cross-reaction with cashew (raw) oil, cardol, anacardic acid, anacardol and cardanol: the incidence and intensity of group reactions were definitely less with the hydrogenated products, such as tetrahydrocardol, tetrahydro-anacardic acid and tetrahydro-anacardol. Hexylresorcinol gave no group reaction. In our own experiments on normal individuals, we could not observe any dermatitis-producing effect, even after a repeated treatment with 1 — 2% ointments of sodium anacardate or cashew nut oil (*).

Among other substances of similar chemical structure two more should be enumerated here: pelandjauic acid $C_{17}H_{31}C_6H_3OHCO_2H$ (from the tree Pentaspadon Motleyi Hook) which possesses 2 Carbon atoms more than anacardic acid, and 3 geranyl catechol

$$\text{(ring: OH, OH)}-CH_2\,CH = \underset{\displaystyle CH_3}{C} - CH_2 - CH_2 - CH = C\begin{smallmatrix} CH_3 \\ CH_3 \end{smallmatrix}$$

All these substances have been known for their skin irritating activity, which seems in part due to the OH groups in the ring (Sizer and Prokosch).

Surface active substances with bactericidal activity have also been isolated from lower plants such as certain fractions of pyocyanase (Pseudomonas aeruginosa: Birch-Hirschfeld), and gramicidin and tyrocidin from bac. brevis. According to Herrell, gramicidin "appeared to behave somewhat as an anionic detergent" which does not prevent its destruction by other anionic or cationic

(*) Raw cashew nutshell liquid, when left in contact with the skin surface during 1 hour, produces a servere dermatitis after a 24 hour's interval.

detergents. It has in common with other anionic detergents the specific action against gram positive bacteria and the inactivation by serum and phospholipids. On the other hand, tyrocidin acts more like a cationic detergent. "The mode of action of gramicidin and tyrocidin may differ in degree or kind and may involve different combinations of interference with normal cellular metabolism, however there seems little doubt that both substances behave biologically in a manner similar to that of certain detergents" (Herrell).

ABSTRACT

The sodium salt of anacardic acid, one of the main constituents of Cashew nut oil, belongs to the most active anionic detergents. Apart from its high staphylococcidal power, equalled by few members of this group, it is also very active against other gram-positive bacteria up to dilutions varying from 1/200000 — 1/2000000, at a contact time of 15'. Amongst the gram-negative germs gonococci and meningococci are highly sensitive to Na anacardate; to a lesser degree also Brucellae, Pasteurellae and Influenza bacilli. The only sensitive germs amonst the Enterobacteriaceae are the proteus bacilli which, being more resistant than gram-positive bacteria, are killed only by higher concentrations (1/200 — 1/2000), whereas weaker concentrations suppress only the growth of the H forms. Tubercle bacilli are less sensitive than other gram-positive bacteria, but they die also after a 30 minutes' contact with a 1/100000 solution (human strain Katti: a bovine strain proved to be somewhat more resistant). The Spirochaeta gallinarum is highly sensitive. Yeasts and molds, with few exceptions, are very resistant. The vegetative forms of anaerobic bacilli are readily killed; the spores of Cl. septicum and Cl. tetani survive even a prolonged contact (1 hour) with a 1/100 solution, whereas the spores of Cl. perfringens and of aerobic bacilli (anthrax) are rather sensitive. Proteins (serum) reduce the bactericidal activity of Na anacardate, pus only slightly. Similarly, lecithin and concentrated autolysates from gram-positive as well as gram-negative bacteria lower the bactericidal power of Na anacardate. Experiments on animals (mice) did not reveal any chemotherapeutic activity of sodium anacardate. The bactericidal activity of Na anacardate is largely independent of the actual pH, which might be explained by the probable presence of undissociated anacardic acid even in (weakly) alkaline solutions.

18 subproducts of anacardic acid and Cardol were studied and compared as to their bactericidal power. It could be shown that neither the saturation of the side chain, nor the etherification of the phenolic group, nor the esterification of the carboxylic group, abolish the germicidal activity of anacardic acid. This can be achieved only by simultaneous substitution of both hydrogens at the ring.

The high bactericidal activity of anacardic acid seems related to the coexistence of an aromatic nucleus and a long aliphatic side chain. The relation between anacardic acid, cardol and similar substances of vegetal origin (Urushiol, Bhilawanol, Pelandjauic acid etc.) is discussed.

RESUMO

O sal de sódio do ácido anacárdico, um dos constituintes principais do oleo de cajú, pertence ao grupo dos detergentes aniônicos mais ativos. Além de seu alto poder antiestafilocócico, igualado por poucos membros dêste grupo, êle é também ativo contra outras bactérias gram-positivas, com um tempo de 15 minutos de contacto, até diluições que variem de 1/200000 a 1/2000000. Entre os germes gram-negativos, os gonococos e meningococos são altamente sensíveis ao anacardato de sódio e, em menor gráu, também as Brucelas, Pasteurelas e bacilos da influenza. Entre as Enterobactériaceas os únicos sensíveis são os bacilos Proteus; êles são mais resistentes do que as bactérias gram-positivas e só morrem em concentrações mais altas de anacardato sódico (1/200 a 1/2000) enquanto que concentrações mais fracas somente suprimem o crescimento das formas H. Os bacilos da tuberculose são menos sensíveis do que outras bactérias gram-positivas, mas morrem também depois de 30 minutos em contacto com uma solução a 1/100000 (raça Ratti humana; uma raça bovina mostrou-se um pouco mais resistente). O Spirochaeta gallinarum é altamente sensível. Leveduras e bolores, com poucas exceções, são muito resistentes. As formas vegetativas dos bacilos anaeróbios morrem prontamente; os esporos de Cl. septicum e Cl. tetani sobrevivem a um contacto prolongado (1 hora) com uma solução a 1/100, enquanto que os esporos de Cl. perfringens e de bacilos aeróbios (antrax) são mais sensíveis. As proteinas (do sôro) reduzem a atividade bactericida do anacardato de sódio e o pus só reduz fracamente. Do mesmo modo, lecitina e autolizados concentrados, tanto de bactérias gram-negativas como positivas, abaixam a atividade bactericida do anacardato de sódio.

As experiências em animais (camundongos) não revelaram qualquer atividade quimioterápica do anacardato de sódio. Sua atividade bactericida é largamente independente do pH o que pode ser explicado pela provável presença de ácido anacárdico não dissociado mesmo em soluções (fracamente) alcalinas.

Foram estudados 18 subprodutos do ácido anacárdico e do Cardol, bem como comparadas suas atividades bactericidas. Tanto a saturação da cadeia

lateral, como a eterificação do grupo fenólico ou a esterificação do grupo carboxílico, não puderam abolir a atividade germicida do ácido anacárdico. Isto só foi conseguido pela substituição simultânea de ambos os átomos de hidrogênio do núcleo.

A alta atividade bactericida do ácido anacárdico parece estar ligada à coexistência na molécula de um núcleo aromático e de uma longa cadeia lateral alifática. A relação entre ácido anacárdico, cardol e substâncias similares de origem vegetal (Urushiol, Bhilawanol, ácido Pelandjauico, etc.) é discutida.

Acknowledgements — I wish to express my gratitude to prof. H. Hauptmann and to Miss H. Rothschild of the Chemical Department of the Faculdade de Filosofia, Ciencias e Letras, São Paulo, for the laborious preparation of most of the mentioned products and for many valuable suggestions that have stimulated this work. I am equally indebted to Dr. H. Gleich and Miss B. Schwarzaid for the preparation of another part of the enumerated compounds. I also wish to thank Prof. R. Wasicky of the Faculdade de Farmacia e Odontologia, São Paulo, for the encouraging interest he has taken in this study.

REFERENCES

1. *Anonymous.* Penicillinlike substances from higher plants (Editorial), *J. Amer. Med. Assn.*, 127(9):522-523, 1945.
2. *Baker, Z.; Harrison, R. W. & Miller, B. F.* Action of synthetic detergents on the metabolism of bacteria, *J. Exper. Med.*, 73:249-271, 1941.
3. *Birsch-Hirschfeld, L.* Versuche zur Analyse der Pyocyanase, *Zschr. f. Hyg. u. Inf. Kr.*, 116:304-314, 1934/35.
4. *Dubos, R. J.* Antimicrobiological agents of biologic origin, *J. Amer. Med. Assn.*, 124(10):633-637, 1944.
5. *Eichbaum, F. W.; Hauptmann, H. & Rothschild, H.* Preparação e ação biológica de ácido anacárdico e alguns derivados, *Anais Assoc. Quim. Brasil.*, 4:83-94, 1945.
6. *Furtado, J. J.* Sobre o oleo de Cajú, *Rev. Brasil. de Farm.*, 26(2):7-10, 1945.
7. *Goldschmith, N. R.* Dermatitis from Semicarpium anacardium (Bhilawanol or the marking nut) spread by mail, *J. Amer. Med. Assn.*, 123(1):27, 1943.
8. *Hansen, G. A. & Looft, C.* Leprosy in its clinical and pathological aspects, Chapter VIII "Treatment", Bristol, 1895.
9. *Herrell, W. E.* Penicillin and other antibiotic agents, Philadelphia and London, W. B. Saunders Co., 1945.
10. *Keil, H.; Wasserman, D. & Dawson, C. H.* The relation of hypersensitiveness to poison ivy and cashew nutshell liquid, *Science*, 102(2646):279-280, 1945.
11. *Keil, H.; Wasserman, D. & Dawson, C. H.* The relation of chemical structure in catechol compounds and derivatives to poison ivy, hypersensitiveness in man as shown by the patch test, *J. Exper. Med.*, 80(3):275-287, 1944.
12. *Lacerda, P. Araujo Feio.* Anacardium occidentale L. Cajueiro, *Rev. Flora Med.*, 8(1/6):39-87, 1941.

13. *Larson, W. P.* The influence of the surface tension of the culture medium on bacterial growth, *Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med.*, 19:62-63, 1921/22.

14. *Larson, W. P.; Evans, R. D. & Nelson, E.* The effect of sodium ricinoleate upon bacterial toxins and the value of soap toxin mixtures as antigens. *Ibid.*, 22:194-196, 1924/25.

15. *Larson, W. P. & Montank, I. A.* The effect of wetting on the pathogenicity and viability of the tubercle bacillus, *Ibid.*, 20:229-232, 1922/23.

16. *Larson, W. P. & Nelson, E.* The effect on the surface tension of the medium upon bacterial growth, *Ibid.*, 21:278, 1923/24.

17. *Lima, A.* Tratamento da Lepra. *Brasil Medico*, 9(4):25-28, 1895.

18. *Lominsky, I. & Lendrum, A. C.* The effect of surface active agents on Bac. proteus, *J. Path. a. Bact.*, 54:421-433, 1942.

19. *Lucas, E. H. & Lewis, R. W.* Antibacterial substances in organs from higher plants, *Science*, 100(2609):597-599, 1944.

20. *Morais, M. O.* O oleo de cajú na lepra, *Rev. Brasil. de Farm.*, 26:17-20, 1945.

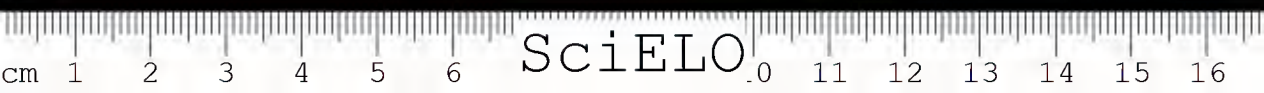
21. *Neisser, M. & Eichbaum, F. W.* Die oligodynamische Metallwirkung in Theorie und Praxis, *Erg. Hyg., Bakt. Immunitätsf.*, 13:170-226, 1932.

22. *Osborn, E. M.* On occurrence of antibacterial substances in green plants, *Brit. J. Exper. Pathol.*, 24:227-231, 1943.

23. *Osterhout, W. J. V.* Quoted by Baker and coll. (2).

24. *Sizer, I. W. & Prokesch, C. E.* Inactivation of the irritant toxicants of poison ivy and related compounds by tyrosinase, *Science*, 101:517-518, 1945.

25. *Staedeler* (quoted by:) *Jahresber. d. Chemie*, 1:574, 1847/48.

N.B. For the technical literature on cashew nut oil and subproducts cf. Damitis, F. M. "Cashew Nut Oil" in "Protective and Decorative Coatings", Vol. I, New York, John Wiley and Sons, Inc., p. 74-101, 1941.

BIOLOGICAL PROPERTIES OF ANACARDIC ACID (O-PENTADECADIENYL-SALICYLIC ACID) AND RELATED COMPOUNDS

BY F. W. EICHBAUM

(From the Department of Microbiology of the Escola Paulista de Medicina and the Department of Immunology of the Instituto Butantan, S. Paulo, Brazil)

PART II

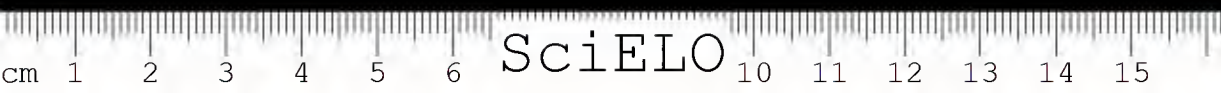
ANTI-ENZYMATIC AND ANTITOXIC ACTION OF ANACARDIC ACID AND DERIVATIVES

It has been shown in the previous paper, that Na anacardate belongs to the most potent anionic detergents, as far as its bactericidal activity is concerned. The specific antibacterial activity of these substances is explained by the observation of Baker, Harrison and Miller that the synthetic detergents inhibit selectively the metabolism of gram-positive bacteria, whereas gram-negative bacteria are not interfered with (*).

The anti-enzymatic activity of anionic detergents is not only restricted to the inhibition of respiratory and glycolytic ferments of bacteria, but has been observed also with other enzymatic systems. Fogelson and Shoch describe the pepsin denaturating power of Sodiumalkylsulfate, which they recommend as a new therapeutic substance for the control of gastric ulcers. McFarlane and Knight mention the inactivation of perfringens lecithinase by surface denaturation and sodiumdodecylsulfate. Finally, the destruction of bacterial toxins and animal venoms (Larson *et al.*) by anionic detergents might be compared to the anti-enzymatic activity, since there exist many analogies between the mode of action of certain venoms and toxins on the one hand and tryptic ferments on the other.

The following paper deals with the action *in vitro* of anacardic acid and related substances on catalase, peroxidase, gastric pepsin, trypsin (pancreatin), snake venoms, tetanus toxin, diphtheria toxin, perfringens lecithinase.

(*) The only exception within the group of gram-negative bacteria is the proteus bacillus which was inhibited by Tergitol 7. In a similar way, the proteus bacillus was, among the Entereobacteriaceae, the only germ sensitive to anacardic acid. Other gram-negative genera such as Neisseria, Pasteurella, which also proved to be sensitive to anacardic acid, were not tested in Baker's *et al.* experiments.

Received for publication in 16/2/946.

Experimental

1. *Catalases and peroxidases*

0.2 cc of a 1% Na anac (*) solution were added to a 24 hour glucose broth culture of hemolytic Staphylococci. After 15' contact, 1 cc of a 3% H_2O_2 solution was added to the culture. After a short interval, small bubbles appeared and formed a foam on the surface of the broth.

Although Sodium anacardate, in the concentration used, kills the staphylococci, with certainty after a few seconds, *catalase is not destroyed*. Similary, the catalase and peroxydases in plant tissue are not destroyed by Na anac:

Small slices of a freshly cut potato were immersed for 15' into a 1% Na anac solution; after addition of H_2O_2, abundant formation of gas bubbles could be observed; on further additions of benzidin in acetic acid, the color of the slices turned blue (peroxydase). In an other experiment, the potato cubes remained immersed in a 1% Na anac solution for 1 hour. After careful washing with destilled water, they were put into a 3% H_2O_2 solution or into a mixture of H_2O_2-benzidin-acetic acid. Even so, the catalase and the peroxydase ferments remained intact.

2. *Gastric Pepsin*

Fibrin threads from rabbit blood were dyed in an ammoniacal carmin solution and suspended in an acid solution of pepsin ("Poulenc" — 500 mg/cc) to which various amounts of Na anac were added. The colour produced in the solution and the gradual dissolution of the fibrin were checked during a 24 hours' incubation at 45° (Gruetzner's method cf. U. S. Dispensatory 23 ed. p. 829).

Result: The degree of digestion was the same for the control tube (Pepsin + HCl) and for the test tubes wich contained in addition 1/300, 1/3000, 1/30000 Na anac solutions, respectively: Gastric pepsin is not destroyed by Sodium anacardate.

3. *Trypsin*

a. 50 mg of commercial pancreatine ("Endochimica") were suspended in 100 cc destilled water, vigorously shaken for 3' and poured into a glass cylinder. When after half an hour's interval the coarse particles had settled, 50 cc of the supernatant fluid were decanted and used in the experiment. *b*. preparation of sodium caseinate: To 100 mg Sodium caseinate ("Meister, Lucius and Bruening-Hoechst") 100 cc of destilled water and 2 cc of a n/10 NaOH were added.

(*) "Na anac" is short for Sodium anacardate.

In order to promote the ready dissolution of the caseinate, the liquid was put into a water bath for 1/2 hour at 37°: after that, the opalescent fluid was filtered through coarse filter paper. c. "Reagent": Glacial acetic acid 1,0; water 9,0; Alcohol 10,0.

Test: to a series of 14 tubes, containing a mixture of Na caseinate, trypsin, and Na anac, as indicated in the following table n.° I, 25 drops of the "reagent" were added, after 60 minutes' contact at 40°. The "reagent" precipitates the non-digested caseinate; the completely digested solutions remain clear. Some difficulty in the reading of the results was encountered in the tubes which contained Na anacardate, since the addition of the acid reagent causes the formation of water-insoluble anacardic acid, and hence a homogenous turbidity of the liquid. When the tubes remained for two hours at room temperature, or even as long as 24 hours, anacardic acid proved to give a stable suspension, which practically formed no sediment; on the other hand, the undigested casein treated with the acid reagent formed a heavy precipitate which after two hours had almost completely settled to the bottom, leaving a clear supernatant fluid.

TABLE No. I

Inhibition of the tryptic power of pancreatin toward sodium caseinate, in presence of Sodium anacardate

Tube	Sodium Caseinate	Destilled water	Buffer (*) solution pH 7.4	Sodium anacardate solution 1/100	1/1000	1/10000	Pancreatin	Precipitate (**)
1	5 cc	1 cc	2 cc	—	—	—	2 cc	∅
2	5 cc	3 cc	2 cc	—	—	—	—	++++
3	5 cc	—	2 cc	1 cc	—	—	2 cc	++++
4	5 cc	—	2 cc	—	1 cc	—	2 cc	++·+++
5	5 cc	—	2 cc	—	—	1 cc	2 cc	+
6	—	5 cc	2 cc	1 cc	—	—	2 cc	∅
7	—	5 cc	2 cc	—	1 cc	—	2 cc	∅
8	—	5 cc	2 cc	—	—	1 cc	2 cc	∅
9	—	7 cc	2 cc	1 cc	—	—	—	∅
10	—	7 cc	2 cc	—	1 cc	—	—	∅
11	—	7 cc	2 cc	—	—	1 cc	—	∅
12	5 cc	2 cc	2 cc	1 cc	—	—	—	++++
13	5 cc	2 cc	2 cc	—	1 cc	—	—	++++
14	5 cc	2 cc	2 cc	—	—	1 cc	—	++++

(*) $\frac{m}{10}$ Monopotassium phosphate 5.36 cc + $\frac{m}{20}$ Borax ($Na_2B_4O_7.10H_2O$) 4.64 cc

Readings:
∅ = absence of precipitate (total digestion of casein)
\+ = weak precipitate
++ = medium precipitate
+++ = strong precipitate
++++ = heavy precipitate (complete absence of digestion).

(**) After addition of the "reagent".

Result: This experiment shows that 1 cc of a 1/100 sol. of Sodium anacardate in a total volume of 10 cc, corresponding to a 1/1000 dilution, inhibits completely the digestion of casein by trypsin. The inhibition by a 1/10000 dilution of anacardic acid is almost complete, by a 1/100000 dilution only weak.

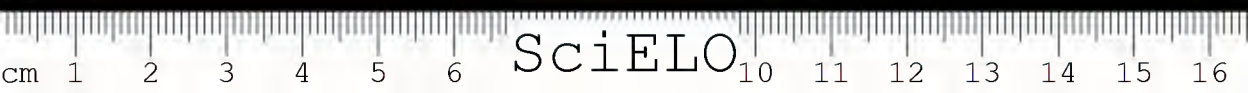
The trypsin inhibiting power of Sodium linoleate and ricinoleate, tested in the same way, was found to be inferior to the activity of the anacardium salt. Even the strongest concentration (1/1000) of Sodium linoleate or ricinoleate caused only a partial inhibition (++) of the trypsin digesting power of pancreatic trypsin.

Inactivation of coagulants by Na anacardate

The trypsin inactivating power of sodium anacardate can also be demonstrated by the destruction of the coagulating activity of trypsin on blood plasma. Other coagulating agents such as snake venoms (*Bothrops atrox*, *Bothrops jararaca*, *Crotalus terrificus terrificus*) and thrombin, are likewise inhibited by Na anacardate and, to a weaker degree, by some other anionic detergents, whereas thromboplastin displays its full activity even in presence of high anacardate concentrations.

This difference between thromboplastin on the one hand and the other mentioned coagulants on the other, is explained by the fact that phospholipids inhibit not only the bactericidal power, but apparently also the antitryptic power of the anionic detergents. Since thromboplastin (from rabbit brain) consists mainly of phospholipids, the specific action of anacardic acid is neutralized by this substance.

Methods — The various coagulant reagents were tested in progressive dilutions (1/2, 1/4, 1/8) using as diluting menstruum: 1) physiologic saline solution (controls) and 2) various dilutions of Na anacardate or other anionic detergents, which also had been prepared with physiologic saline.

0.2 cc of the various "coagulant dilutions" were rapidly blown into a small test tube (5 cm/5 mm) containing 0.2 cc of oxalated rabbits plasma (2 cc M/10 Na oxalate for each 20 cc of total blood). Coagulation was checked for three minutes, during which time the tubes were constantly moved, allowing the liquid to run in a constant flow along the walls of the tube. The first appearence of a coagulum was considered as "coagulation time". When after 3' no coaguluum had formed, the coagulation time was marked as ∞, although in many instances coagulation took place after 5, 10 or even 30 minutes and more.

Coagulant reagents:

1. a 1°/₀₀ solution of venom of *Bothrops jararaca* } in physiologic saline.
2. a 1°/₀₀ sol. of venom of *Bothrops atrox*. } in physiologic saline.
3. a 1°/₀₀ sol. of venom of *Crotalus terrificus*. } in physiologic saline.

4. a "F. S." (full strength) thrombin solution, prepared according to Quick's method. In order to avoid the formation of calcium anacardates with low solubility, the calcium used in the preparation of thrombin (0.8 cc m/10 Ca Cl_2 for 16 cc of the thrombin solution) was removed by adding an excess of Na oxalate (1 cc of a m/10 Na oxalate sol.). After centrifugation the supernatant liquid was used as "decalcified thrombin "F. S.).

5. a thromboplastin sol., prepared according to Quick's method.

6. a 0.5% solution of crystalline trypsin (prepared from Northrop's Mg SO_4 trypsin, 100 mg of which had been dissolved in 20 cc of n/100 HCl solution and which were dialyzed for 48 hours against n/100 HCl). The dialyzed solution was neutralized with NaOH and filtered. The ready solution was marked as 0.5% trypsin solution.

TABLE No. II

Inhibition of the coagulating power of snake venoms, Thrombin and Trypsin by Sodium anacardate, Sodium linoleate and Sodium ricinoleate

Coagulation time with

Diluting Menstruum	Venom *Bothrops jararaca* 1 mg/cc			Venom *Bothrops atrox* 1 mg/cc			Decalcified Thrombin F. S.			Trypsin 5 mg/cc
	1/2	1/4	1/8	1	1/4	1/8	1/2	1/5	1/10	1/2
Physiolog. saline	38″	48″	60″	20″	28″	39″	16″	31″	48″	70″
Na anac. 1/1000	∞	∞	∞	∞	∞	∞	∞	∞	∞	∞
Na anac. 1/5000	73″	∞	∞	28″	2′34″	∞	36″	∞	—	—
Na anac. 1/10000 ...	50″	∞	∞	21″	38″	2′30″	31″	75″	71″	71″
Na anac. 1/30000 ...	33″	56″	∞	22″	29″	40″	—	—	∞	—
Na anac. 1/50000 ...	44″	49″	2′42″	—	—	—	—	—	—	—
Na anac. 1/100000 ..	39″	44″	68″	—	—	—	20″	31″	54″	—
Sodium linoleate 1/100	—	—	—	35″	—	—	—	—	—	—
Sodium linoleate 1/500	—	—	—	21″	—	—	—	—	—	—
Sodium ricinoleate 1/100	—	—	—	∞	—	—	—	—	—	—
Sodium ricinoleate 1/500	—	—	—	35″	—	—	—	—	—	—
Sodium ricinoleate 1/1000	—	—	—	—	—	—	15″	29″	57″	—

Result — The foregoing table No. II and graph No. I show the strong inhibiting action of Na anacardate on various coagulants. The highest sensitiveness towards Na anac was found with the venom of *Bothrops jararaca*, which in a 1/8 dilution was inhibited even by a 1/30000 concentration of the detergent. Sodium linoleate and ricinoleate displayed only a weak anticoagulating activity.

Similar results were obtained with the venom of *Crotalus terrificus* (cascavel), though in this case the coagulase inhibiting activity of anacardic acid was weaker than with the bothrops venoms and trypsin. The coagulating action of thromboplastin (from rabbit brain) is not inhibited even by high concentrations (1/100) of the anacardates.

GRAPH No. I

The hydrogenated product Na tetrahydro-anacardate produces the same inactivating effect as Na anacardate, whereas dimethylanacardic acid, which had no bactericidal action either, proved to be inactive against the coagulating fraction of snake venoms.

In the same way that lecithin inhibits the bactericidal action of the anacardates, it also destroys their antitoxic (anticoagulating) activity. Other anionic detergents such as Na linoleate and Na ricinoleate are inactivated in the same manner, in presence of lecithin:

TABLE No. III

Substance	Tube No.								
	I.	II.	III.	IV.	V.	VI.	VII.	VIII.	IX.
Sol. of Bothrops (jararaca) venom 1 mg/cc	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	— cc
Physiolog. saline solution .	1.0	0.5	0.5	0.5	—	—	—	0.5	1.0 "
Sol. of egg lecithin 1/1000	—	—	—	—	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5 "
Sol. Na anacardate 1/1000	—	0.5	—	—	0.5	—	—	—	— "
Sol. Na linoleate 1/100 ..	—	—	0.5	—	—	0.5	—	—	— "
Sol. Na ricinoleate 1/100	—	—	—	0.5	—	—	0.5	—	— "
From each tube 0.2 cc are transferred into 0.2 cc of oxalated rabbit plasma.									
Coagulation time	30"	∞	50"	180"	30"	34"	64"	30"	∞

This inhibition by lecithin takes place, however, only when the reactives are mixed in the following order: *Venom* (trypsin) - *lecithin-detergent* (anacardates, linoleate, etc.).. When the order is inverted to: *venom-detergent-lecithin*, there is little or no inhibition of the antitoxic (anticoagulating) action.

Ferguson and Erickson have shown that trypsin needs small quantities of ionized calcium in order to display its full activity. It might be supposed, therefore, that the addition of anacardates (*), resulting in the formation of little dissociable Ca salts, could be responsible for the lack of coagulation in the mixture trypsin-Ca-anacardate-plasma. The specific lecithin inhibition, depending on the order of mixture of the reactives, affords a method of solving this problem:

(*) Na anacardate by itself, when added to liquid blood, does not influence the spontaneous coagulation.

TABLE No. IV

Plasmocoagulation by trypsin in presence of Na anacardate and lecithin. Significance of the order, in which the reactives are mixed.

Technique: Solutions:
1. Trypsin 0.5% sol. (prepar. cf. pag. 101)
2. Lecithin (a 2.5% alcoholic sol., diluted with physiol. saline to 1/1000)
3. NaCl = physiol. saline 0.85%
4. Na anacardate 1/1000 sol. in physiol. saline.

The reactives listed under "A" and "B" (in the following table) were mixed, separately. After a 5' intervall "B" is added to "A"; after careful mixing of the A and B solutions, 0,3 cc were withdrawn from each tube and added to 0,2 cc of oxalated rabbits plasma. Readings at room temperature.

Tube No.	1	2	3	4	5	6	7	8
A	Trypsin 0,3 cc NaCl 0,5 cc $CaCl_2$ 0,2 cc	Trypsin 0,3 cc NaCl 0,3 cc	NaCl 0,6 cc Lecithin 0,2 cc $CaCl_2$ 0,2 cc	Trypsin 0,3 cc Na anac. 0,3 cc	Trypsin 0,3 cc NaCl 0,2 cc	Trypsin 0,3 cc Lecithin 0,2 cc	Trypsin 0,3 cc $CaCl_2$ 0,2 cc	Trypsin 0,3 cc $CaCl_2$ 0,2 cc
B	....	Lecithin 0,2 cc $CaCl_2$ 0,2 cc		$CaCl_2$ 0,2 cc Lecithin 0,2 cc	Na anac. 0,3 cc $CaCl_2$ 0,2 cc	Na anac. 0,3 cc $CaCl_2$ 0,2 cc	Lecithin 0,2 cc Na anac. 0,3 cc	Na anac. 0,3 cc NaCl 0,2 cc
Coagulation time	120"	94"	∞	∞	∞	38"	45"	∞

Results — a) the coagulation of plasma by trypsin (=120" — tube 1) is accelerated in presence of lecithin (=94" — tube 2).

b) Na anacardate inhibits the coagulating action of trypsin (= ∞, tube 5 and 8).

c) The addition of lecithin in the order:

Trypsin-lecithin + Na anac-$CaCl_2$ abolishes the inhibiting action of Na anac. The coagulation is *even more accelerated* (= 38" — tube 6), and this in spite of a certain disionization of the $CaCl_2$ in the mixture Na anac — $CaCl_2$. This proves that the inhibiting action of Na anac on trypsin + $CaCl_2$ (tube 8) is due to a direct interaction between the detergent and the enzyme without interference of the Ca.

d) A similar result to that in tube 6 is obtained in tube 7, where the lecithin is mixed directly with the Na anac solution and only afterwards added to the trypsin — $CaCl_2$ mixture.

e) on the other hand, tube 4 shows that lecithin does not dissociate the complex trypsin-Na anac, when the reactives are mixed in the order:

(Trypsin — Na anac) + (Lecithin — Ca Cl_2) :coagulation time ∞

Compare with this result, that of tube 6 with inverted order of reagents;

(Trypsin — Lecithin) + (Na anac — Ca Cl_2): coagulation time 38"

This means that the affinity of Na anac to lecithin is greater than to trypsin, when *both* substances are exposed simultaneously to the action of the detergent.

Perfringens — lecithinase

A 1/1000 solution of Sodium anacardate inhibits completely the lecithinase activity of 1 L✠ of perfringens toxin, as shown by the following experiments:

TABLE No. V

Tube	Perfringens toxin 1 L✠/cc	Sodium anacardate			Egg lecithin emulsion		Result: Lecithinase
1	0,5 cc	1/100	0,5 cc	1/2 hour's	0,5 cc	1/2 hour's	0
2	0,5 cc	1/500	0,5 cc	contact at	0,5 cc	contact at	0
3	0,5 cc	1/1000	0,5 cc	room tem-	0,5 cc	50°	0
4	0,5 cc	1/2500	0,5 cc	perature.	0,5 cc		+
5	0,5 cc	1/5000	0,5 cc		0,5 cc		+
6	0,5 cc	1/10000	0,5 cc		0,5 cc		+
7	0,5 cc	Phys. saline	0,5 cc		0,5 cc		+

Discussion

Our negative results concerning the action of anacardic acid on oxidizing ferments and pepsin seem to be in conflict with the findings made by Baker, Harrison and Miller in other detergents. It should be borne in mind, however, that our experiments were performed in complex media, possibly containing some inhibiting factors, which were absent under the more rigorous working conditions in the experiments of the authors mentioned. On the other hand, the difference between "staphylococcidal action" and the "survival" of catalase in our own experiments points to a probable difference between the anti-enzymatic activity of anacardic acid and the anionic detergents tested by Baker *et al.*

The action in vivo of snake venoms and bacterial toxins, previously inactivated by Na anacardate

The *in-vitro* destruction of the coagulating power of certain snake venoms led to the attempt to determine whether their neurotoxic activity was equally abolished by treatment with anacardate solutions. In a similar way, we also tested the *in vivo* action of tetanus and diphtheria toxins which had been exposed, *in vitro*, to the action of Na anacardate for varying lengths of time (*).

I. *Snake venoms*: These experiments were performed on a total of 30 pigeons with a mean weight of about 300 grams. The animals received, by *intravenous route*, the following substances: a) venom of *Bothrops jararaca;* b) sodium anacardate or sodium tetrahydro-anacardate; c) a mixture of a) and b). The total volume of the injected substances amounted in each case to 2 cc. Physiologic saline solution was used as diluting medium.

Results — 1.) 0.25 mg — 1 mg of venom of *Bothrops jararaca* killed the pigeons within ½' - 3' under violent clonic convulsions (**).

2.) Sodium anacardate and sodium tetrahydro-anacardate, in quantities from 5 mg — 25 mg dissolved in 2 cc saline, were generally supported without any general or local symptoms, whereas greater amounts (50 mg — 100 mg) provoked a deadly shock with symptoms not unlike the reaction caused by the venom proper.

3.) 0.25 mg — 0.5 mg of snake venom were detoxicated almost immediately by the addition of 5 mg Na anac (0.5 cc of a 1% sol.). Some of the animals which had been injected with this mixture showed repeated vomiting, 5 — 15 minutes following the injection. In two cases the animals developed a paralysis of the legs which, however, disappeared completely after 24 hours. Only one,

(*) The pH of the watery Na anac. solution varied between 7.2-7.6.

(**) 1 mg corresponds to about 50 M.L.D. (for the pigeon).

among 12 animals, died 30 minutes after the injection of a mixture of 0.5 mg venom + 5 mg anacardate. Higher doses of venom (1 mg — 5mg) are also detoxicated by the same anacardate doses (5 mg). but only when the contact is prolonged for several (2 — 5) days.

4.) Presence of (horse) serum partly abolished the detoxifying action of the anacardates.

5.) The detoxifying action of Na tetrahydroanacardate is inferior to that the non-hydrogenated product:

TABLE No. VI

Diluting medium	Venom *Bothrops jararaca*	Result (intravenous injection in pigeons)
Physiol. saline	0.25 mg	✠ after 2 minutes
Na tetrahydro-anac. .. 5 mg	0.25 mg	survives more than 3 days
Na anacardate .... 5 mg	0.25 mg	✠ after 55 minutes

(Time of contact between the anacardates and snake venom: 60").

6.) Animals, injected twice — within a month's interval — with an atoxic mixture of venom + anacardate, remained fully sensitive to the action of snake venom when injected after another month's interval with 0.25 mg. venom, also by intravenous route. *Under the given experimental conditions no antigenic activity of the detoxicated venoms could be observed.*

7.) The intravenous injection of 5—10 mgs of Na anacardate, did not protect the animals against the toxic action of a lethal dose of snake venom. injected 2-10' later

II *Tetanus toxin*: Crude tetanus toxin containing 40000 MLD/cc was mixed with equal amounts of a 1% solution of Na anac; after varying intervals of contact at room temperature. the mixture was inoculated, by subcutaneous route, into guinea pigs. The following table shows the influence of contact time on the detoxicating activity of Na anac towards tetanus toxin.

TABLE No. VII

No. of MDL in 0,5 cc toxin	Diluting medium 0,5 cc	Time of contact	*Ratio:* Dead animals / Total No. of animals
20 000	Distilled water	1 hour	8/8
20 000	Na anac. 1%	½ hour	8/8
20 000	Na anac. 1%	1 hour	5/13
20 000	Na anac. 1%	1½ - 2 hours	0/8

Result — The forgoing table No. VII shows, that 20000 MLD of tetanus toxin are detoxified within 1½ — 2 hours, by 0.5 cc of 1% solution of Na anacardate. In order to verify whether the detoxified toxin retains its antigenicity or not, 4 guinea pigs were each given two injections, 14 days apart, of an atoxic mixture of 20000 MLD toxin and anacardate (inactivation time: 2 hours). After 3 more weeks 3 cc blood were withdrawn by cardial puncture from each animal; the pooled sera gave no protection to mice, which were injected with a mixture of 0.25 cc pooled serum + 8 MLD of tetanus toxin; serum and toxin had remained in contact for 1 hour at room temperature before the injection. — The toxin-destroying power of Na anacardate is diminished in the presence of native serum.

III *Diphtheria toxin*: These experiments were performed on guinea pigs (250 — 300g) which received, by subcutaneous route, the toxins which had been treated for a varying length of time with equal amounts of a 1% Na anac solution.

Result — Whereas 20000 MLD of tetanus toxin are inactivad by a 2 hours' contact (at room temperature) with 0.5 cc of a 1% Na anac solution, the detoxication of 1500 — 1750 MLD of diphtheria toxin takes 10 — 14 days, under the same experimental conditions. Small doses (3 MLD/cc) are already detoxicated after a 30 minutes' contact with equal amounts of a 1/1000 Na anac solution (*). Animals which survived the injection of 875 MLD of detoxicated toxin, proved 4 weeks later to be fully sensitive to the reinjection of 44 MLD of diphtheria toxin. Previous antitoxin titration in the sera of these animals revealed no formation of antibodies. The toxin destroying power of Na anacardate is diminished in the presence of native serum.

Conclusions — Sodium anacardate destroys, under the given experimental conditions, the whole toxin complex of snake venoms as well as of bacterial toxins; there is no formation of anatoxin, or any other antigenically active product e. g. of the "kryptotoxin" type.

DISCUSSION

The toxin-destroying action of anionic detergents was described for the first time in 1923/24, by Larson et al. who found castor oil soap very effective against tetanus and diphtheria toxin, whereas botulinus toxin was very resistant to its action. Oleic, stearic, palmitic acid showed no detoxifying action; other soaps

(*) Since the subcutaneous injection of 1% Na anac. solution in guinea pigs often provokes the formation of small necroses, we had difficulty in deciding whether this necrosis was due to the toxin or to Na anac. Only after some experience did we learn to distinguish the characteristic lesions caused by both substances.

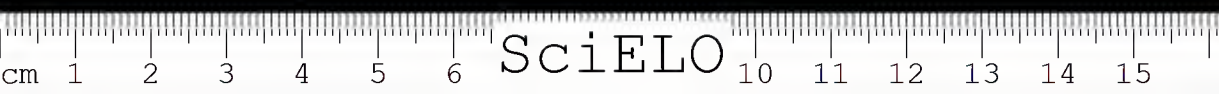
such as lauric, myristic and hendenoic acid salts etc. revealed some detoxifying power, but less than ricinoleate. Larson attributes to the surface activity of these soaps (reduction of surface tension below 40 dynes) a special importance for their detoxifying activity. Diphtheria and tetanus toxin treated with ricinoleat still contained, however, a residue of active toxin. This could be proved by the fact that small amounts of the toxin-soap mixture were innocuous, whereas greater amounts killed the animals, with typical symptoms. When injected in small doses, the innocuous residues of active toxin were sufficient to provoke the formation of antibodies, which could be demonstrated *in vitro* as well as *in vivo*. Carmichael describes the destruction of rattlesnake venom by exposure to a twenty per cent ricinoleate solution for 8 — 24 hours. No reference is made to a possible immunizing power of these detoxified venoms. We might also mention in this respect the early experiments of Frazer (1898) who found an *in vitro* neutralization of cobra venom by ox bile; he attributed to this substance a real "antitoxic" value with even certain curative qualities. As to the *in vitro* inactivation, all later investigators (Wehrmann, Vital Brazil, Calmette *) confirmed Frazer's observation, but none of them was able to verify any therapeutic effect. Frazer tried also to separate the active fraction from the ox bile and he obtained, by precipitation with alcohol, an albuminoid substance with "preventive" potency; nothing is mentioned about the activity of the alcohol-soluble fraction, containing cholesterin and bile salts; especially the latter, representing highly surface-active substances, might act in a manner analogous to that of the detergents mentioned.

Larson's experiments, which demonstrated an immunizing action of the soap-treated toxins, are in conflict with our results, since we could not verify a similar action in bacterial toxins and snake venoms exposed to sodium anacardate.

It has previously been shown that the antibacterial and anti-enzymatic activity of anacardic acid is in the main identical with that of ricinoleic acid, with the difference that the former substance is by far the more potent. Larson's findings would therefore suggest, that a more careful dosage of Na anacardate — sufficient to destroy the main part of the toxin, but leaving intact a smaller fraction, adequate to immunisation — might give similar results to those obtained with ricinoleate.

ABSTRACT

Sodium anacardate and the hydrogenated product sodium tetrahydro-anacardate destroy *in vitro* the tryptic action of pancreatic trypsin. Similarly, the plasma coagulating power of trypsin, thrombin and snake venoms (*Bothrops jarara-*

(*) Calmette mentions also the loss of toxicity of certain microbial toxins, e.g. tetanus toxin, which had remained in contact with fresh ox bile during 24 hours.

ca, Bothrops atrox, Crotalus terrificus terrificus) is abolished by the anacardate- Sodium linoleate and Sodium ricinoleate act in a similar way, but they are les- active than the anacardates mentioned. Dimethyl anacardic acid, which posses- no bactericidal power, does not act on toxins or enzymes either.

The inactivating power of lecithin upon Na anacardate depends on the orde- of mixing the reagents:

When a mixture of coagulant + lecithin is exposed to the action of N- anacardate, this substance no longer inactivates the coagulant. If, however, th- coagulant and Na anacardate are first mixed together and lecithin is added late- Na anacardate retains its full anti-enzymatic activity.

The enzymatic activity of gastric pepsin, plant-and bacterial catalases and p- roxidases, tested in a complex medium, is not destroyed by the anacardates. Lec- thinase from *Clostridium Welchii* is very sensitive to the denaturating action o- anacardates.

Snake venoms (*Bothrops jararaca, Bothrops atrox, Crotalus terrificus terri- ficus*), tetanus toxin and diphtheria toxin are destroyed *in vitro* by the action of N- anacardate. The time necessary for complete detoxication varies for the differe- venoms and toxins, depending also on the concentration of MLD per cc. The v- noms and toxins, treated with Na anacardate, have not only lost their toxic actio- for the test animals, but also their antigenic power.

RESUMO

O anacardato de sódio e o tetrahidro-anacardato de sódio (obtido por hidr- genação) destróem, *in vitro*, a ação triptica da tripsina pancreática. O poder d- tripsina, da trombina e dos venenos de serpentes (*Bothrops jararaca, Bothro- atrox, Crotalus terrificus terrificus*) de coagularem o plasma, é abolido pel- anacardatos. O linoleato e ricinoleato de sódio agem do mesmo modo, mas s- menos ativos. O ácido dimentil-anacardico, que não possúe atividade bacte- cida, também não age sôbre toxinas ou enzimas.

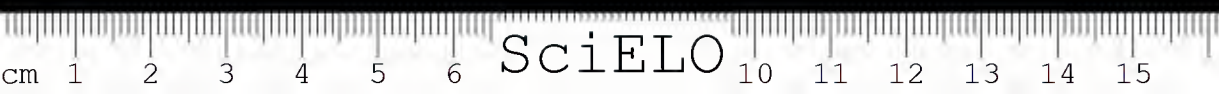
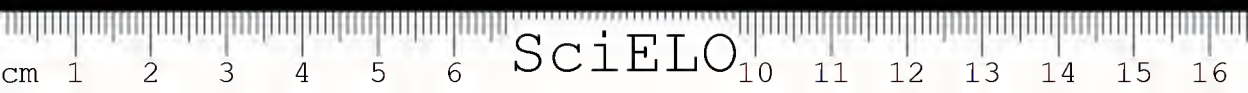
A ação anticoagulante da lecitina sôbre o anacardato de sódio depende d- ordem em que os reativos são misturados: quando u'a mistura de agente co- gulante + lecitina é exposta à ação do anacardato de sódio, esta substância n- mais inativa o coagulante. Entretanto, si o agente coagulante e o anacarda- são misturados e só depois disto é adicionada a lecitina, o anacardato de sód- apresenta sua inteira atividade anti-enzimática.

A atividade enzimática da pepsina gástrica e de catalases e peroxidases d- plantas e bactérias, testada em um meio complexo, não é destruida pelos anaca-

datos. A lecitinase do *Clostridium Welchii* é muito sensível à ação desnaturante dos anacardatos. Venenos de serpente (*Bothrops jararaca, Bothrops atrox, Crotalus terrificus terrificus*) e as toxinas tetânica e diftérica são destruidas *in vitro* pelo anacardato de sódio. O tempo necessário para a desintoxicação completa varía para os diferentes venenos e toxinas e depende também da concentração em D. L. M. por cm³. Os venenos e toxinas, tratados pelo anacardato de sódio, perdem sua ação toxica sôbre os animais testemunhas bem como seu poder antigênico.

Acknowledgement — I am indebted to Dr. M. Rocha e Silva, of the Instituto Biológico, São Paulo, for many valuable suggestions concerning these experiments and for the working facilities he has granted me in his laboratory.

REFERENCES

1. *Baker, Z.; Horrison, R. W. & Miller, B. F.* Action of synthetic detergents on the metabolism of bacteria, *J. Exper. Med.*, **73**:249-271, 1941.
2. *Brazil, V.* Do envenenamento ophidico e seu tratamento. *Collectanea de Trabalhos do Instituto Butantan*, **1**:31-35, 1901/07.
3. *Calmette, A.* Quoted by *Brazil* (2).
4. *Carmichael, E. B.* Detoxification and the immunity production to ricin by sodium ricinoleate, *Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med.*, **24**:5-7, 1926.
5. *Carmichael, E. B.* Detoxification of rattlesnake venom by sodium ricinoleate, *J. Pharmacol.*, **31**:445-454, 1927.
6. *Ferguson, J. H. & Erickson, B. N.* The coagulant action of crystalline trypsin, cephalin and lung extracts, *Amer. J. of Physiol.*, **126**(3):661-668, 1933.
7. *Fogelson, S. J. & Shoch, D. E.* Treatment of gastroduodenal ulcerative disease with sodium alkylsulfate, *Arch. Int. Med.*, **73**(3):212-216, 1944.
8. *Frazer*, quoted by *Brazil* (2).
9. *Larson, W. P.* The influence of the surface tension of the culture medium on bacterial growth, *Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med.*, **19**:62-63, 1921/22.
10. *Larson, W. P.; Evans, R. D. & Nelson, E.* The effect of sodium ricinoleate upon bacterial toxins and the value of soap toxin mixtures as antigens, *Ibid.*, **22**:194-196, 1924/25.
11. *Larson, W. P. & Montank, I. A.* The effect of wetting on the pathogenicity and viability of the tubercle bacillus, *Ibid.*, **20**:229-232, 1922/23.
12. *Larson, W. P. & Nelson, E.* The effect on the surface tension of the medium upon bacterial growth, *Ibid.*, **21**:278, 1923/24.
13. *MacFarlane, M. G. & Knight, B. C. J. C.* The biochemistry of bacterial toxins. I. The lecithinase activity of Cl. welchii toxins, *Biochem. J.*, **35**:884-902, 1941.
14. *Wehrmann*, quoted by *Brazil* (2).

BIOLOGICAL PROPERTIES OF ANACARDIC ACID (O-PENTADECADIENYL-SALICYLIC ACID) AND RELATED COMPOUNDS

BY F. W. EICHBAUM

(From the Department of Microbiology of the Escola Paulista de Medicina and the Department of Immunology of the Instituto Butantan, S. Paulo, Brazil)

PART III

ANTIFEBRILE ACTION OF ANACARDIC ACID AND RELATED COMPOUNDS

The salicylic radical of anacardic acid suggested a possible antifebrile activity of this substance and its chemical derivatives such as Sodium anacardate, acetyl-anacardic acid — corresponding to "Aspirin" — Sodium tetrahydro-anacardate and the ethyl ester of anacardic acid.

The experiments were performed on 70 rabbits and 66 guinea pigs whose temperature had been raised artificially by parenteral (intravenous, intramuscular or intraperitoneal) injection of pyrogenic substances: Novocain, formalinized paratyphoid-, or heat-killed *B. cereus* vaccine. When the temperature, 2-4 hours after the injection of the pyrogenic substance, had risen to 39.5-40°C, the anacardates were given by intravenous, intraperitoneal or oral route. As controls, use was made of animals who had received only the pyrogenic substance and another lot of animals who received in addition Aspirin or Sodium salicylate, in doses corresponding to the anacard doses in gram (*).

The normal (morning) temperature of guinea pigs and rabbits varied between 37.2-38.0°.

1. *Experiments on rabbits* (average weight 2000g): The *intravenous* injection of 3 — 5 cc of a 1% Na anac solution (= 15 — 25 mg per kg body weight) led to a drop in temperature, generally only in those cases where the injection was followed by stronger or weaker shock symptoms of anaphylactoid character (panting, dyspnea) which disappeared in general 30 — 60' after the injection. Only in exceptional cases did the animals die in shock with terminal convulsions.

(*) Note that the molecular weight of anacardic acid is about twice the molecular weight of salicylic acid.

Received for publication in 16/2/46.

The drop in temperature persisted, even when no shock symptoms could be noticed any more. Animals without shock symptoms, following the intravenous injection of Na anacardate, generally did not show any drop in temperature (cf. Table No. I). The *intraperitoneal* injection of 15 cc of a 2% Na anac solution (= 0.15 g per kg body weight) led to a drop in temperature after 1 — 1½ hours; this route of administration, however, proved to be too irritating, since the animals died, generally, 24 hour later with the signs of a heavy sero-fibrinous peritonitis. The *oral* application (*) of 0.4 g (20 cc of a 2% solution or 0.2 g per kg body weight) was in general without effect on the temperature (cf. Table No. II). The reactivity of rabbits varied individually to a high degree: we find Na tetrahydroanacardate very active in animal No. 142 (on 12/XI. cf. Table No. III), but practicably inactive in animal No. 124. Animal No. 146 (Table No. III), which did not react to Acetyl anacardic acid on 12/XI., responded readily to Sodium anacardate on 13/XI. Another animal (No. 142 cf. Table No. III) was refractory to Sodium salicylate, which was found very active in all the other controls, who received the same amount of the drug. This varying reactivity might be partly understood by the fact that anacardic acid and derivatives seem to provoke in some animals an inverse i. e. febrile reaction when given in oral doses of 0.1 g per kg body weight. But this inverse reaction could also not be demonstrated regularly.

II. *Guinea pigs* (average weight 500g). In contrast to the varying reactivity of rabbits towards anacardates, guinea pigs showed a more constant behaviour and responded with a sharp drop in temperature when treated with these drugs by either oral or parenteral route. No significant difference could be found in the antipyretic activity of Na anacardate, the acetylated and other subproducts. The doses given by *intraperitoneal* route amounted to 0.07 — 0.1 g per animal (cf. Table No. IV) or 0.2 g per kg body weight, which corresponds approximately to the doses given to rabbits in the previous experiments. In some instantes, the drop of temperature following the *intraperitoneal* injection was so dramatic, that the guinea pigs died a few hours later with a subnormal temperature of around 35°C. But in general the medium dose of 0.2 g per kg was well supported.

The degree of peritonitis, which developed almost regularly, was much weaker than it appeared in rabbits.

Because of the irritating action of the intraperitoneal injection, we tested the substances also by the *oral* route in animals which had been kept without food for 24 hours. The doses varied beween 5 — 10 cc of 2% solution = 0.2 — 0.4 g per kg body weight. As can be seen in Table No. V the animals re-

(*) introducing the substance by a catheter.

Table I

Antipyretic action of Sodium anacardate 1% injected by intravenous route in rabbits.

The arrow ↓ marks the moment when the Na anacardate solution is injected

Artificial fever by intravenous injection of 2cc heat killed b. cereus vaccine

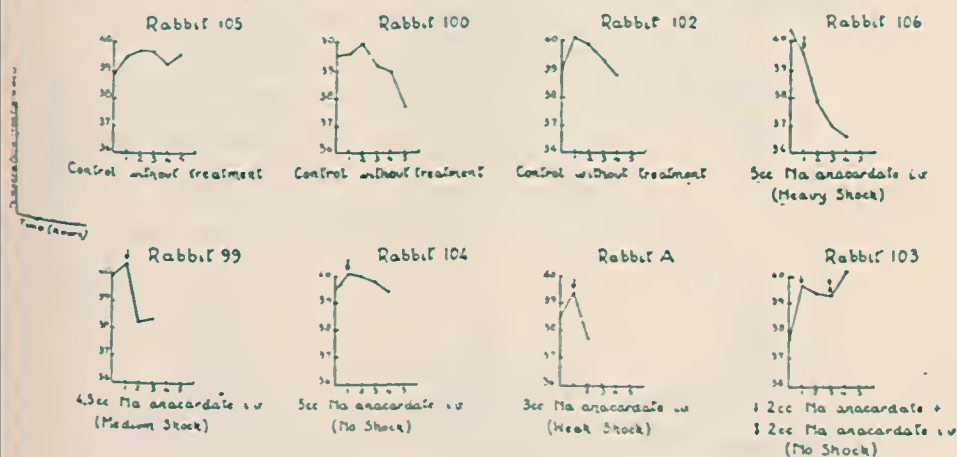



Table II

Antipyretic action of Sodium anacardate and related compounds in rabbits

The arrow ↓ marks the moment when the substance is applied by oral route

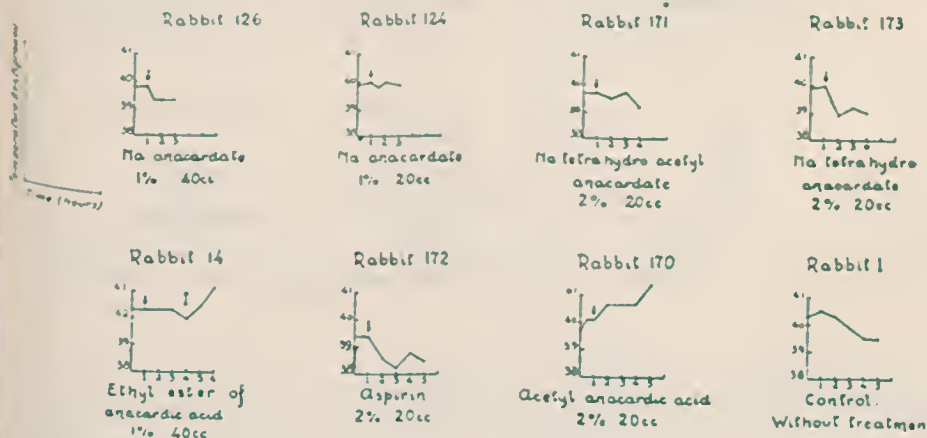
Artificial fever by intraperitoneal injection of 3cc of 1% Novacain solution

pond in this case also with a distinct drop in temperature, about 1 — 2 hours after the injection of the drug. Out of 16 guinea pigs, treated with anacardates by the oral route, all survived but two, who died 24 hours later with the signs of intra-abdominal hemorrhage, apparently originating from the pregnant uterus; in one of these cases the feti were still in the uterus horns. In

Table III

Antipyretic action of Sodium anacardate and derivatives in rabbits

3 animals tested with various substances at 3 subsequent days

The arrow ↓ marks the moment when the substance is applied by oral route

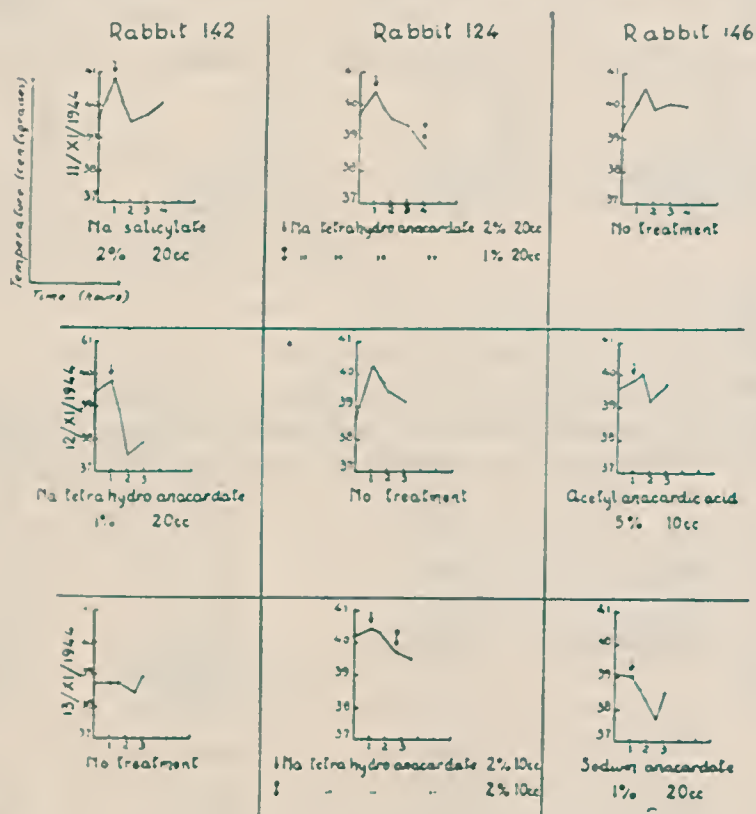
Artificial fever by intravenous injection of 5cc of a formolized paratyphoid vaccine given once on 11-XI-1944

the other case they could not be found there, nor in the free peritoneal cavity either. Some of the surviving animals were killed 24-48 hours after treatment and the alimentary canal was dissected: in some cases, we found small petechial hemorrhages in the gastric mucosa, but otherwise no gross lesions were present in the intestinal canal or the parenchymatous organs.

Table IV

Antipyretic action of derivatives of anacardic acid in guinea pigs

The arrow ↓ marks the moment when the substance is injected by intraperitoneal route

Artificial fever by subcutaneous injection of 1cc of a 1% Novocain solution

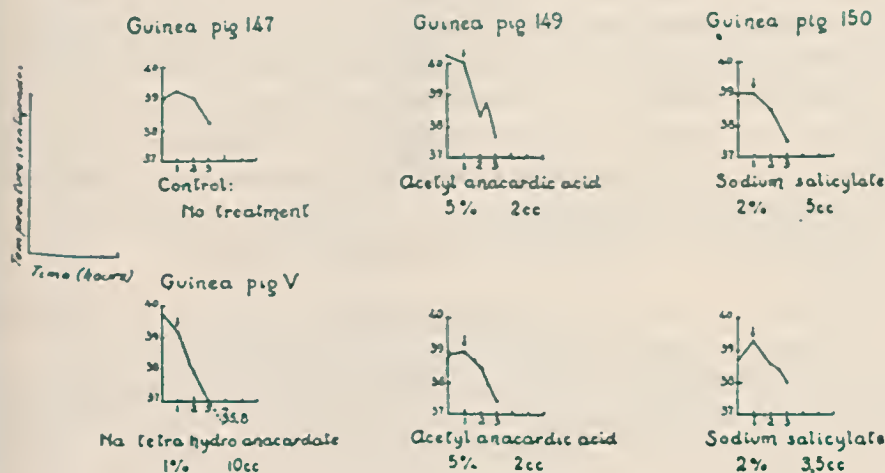
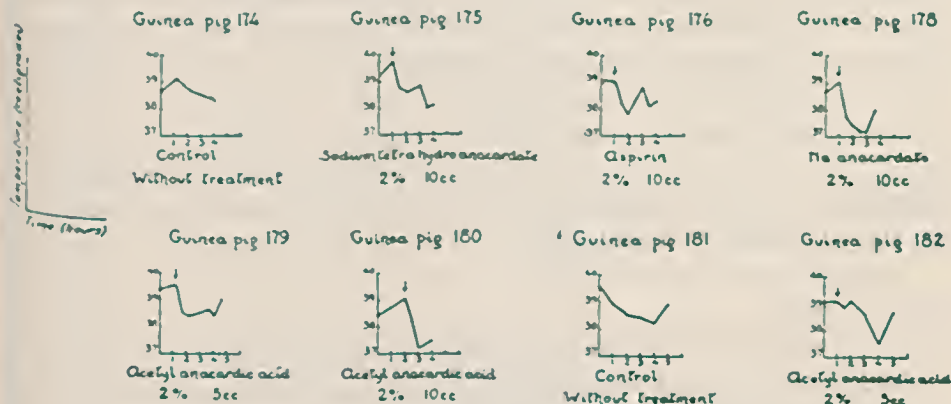



Table V

Antipyretic action of Sodium anacardate and related compounds in guinea pigs

The arrow ↓ marks the moment when the substance is applied by oral route

Artificial fever by intraperitoneal injection of 2cc of a 1% Novocain solution

ABSTRACT

Intravenous injections of Sodium anacardate and related compounds cause in rabbits, whose temperature had been raised artificially, a sudden drop of temperature, which is generally accompanied by heavy shock symptoms. The substances display an antipyretic activity also when given intraperitoneally; on oral application, the individual animals (rabbits) react very irregularly, some showing a definite drop in temperature, others not. Normal animals sometimes respond to oral application of Na anacardate with a rise in temperature.

The antipyretic activity of Na anacardate and related compounds in guinea pigs is much more regular. With rare exceptions all animals showed, on intraperitoneal as well as oral application of the drug, a definite drop of temperature 30-120' following the administration.

The doses given in rabbits and guineapigs varied between 0.1 — 0.4 per kg body weight.

There could not be found any distinct quantitative difference in the activity of Na anacardate, tetrahydro-anacardate and the acetylated products.

The antipyretic activity of Na anacardate and similar compounds is related, probably, to the salicylic nucleus.

RESUMO

A injeção intravenosa de anacardato de sódio e compostos relacionados, produz em coelhos com temperatura elevada artificialmente, uma queda brusca de temperatura, que é geralmente acompanhada por sintomas graves de choque. Estas substancias possuem tambem uma atividade antipirética quando injetadas intraperitonealmente. A resposta individual dos animais (coelhos) à administração oral é muito irregular; alguns mostraram uma queda nítida da temperatura, outros, não. Alguns animais normais apresentam algumas vezes, hipertermia com a administração oral do anacardato de sódio.

A atividade antipirética do anacardato de sódio e compostos relacionados é muito mais regular na cobaia. Com raras exceções, 30 a 120 minutos após administração oral ou intraperitoneal da droga, todos os animais mostraram uma queda definida da temperatura.

As doses administradas a coelhos e cobaias variavam de 0.1 a 0.4 g por kg de peso corporal.

Não pode ser observada qualquer diferença significativa entre as atividades do anacardato de sódio, tetrahidro-anacardato e os produtos acetilados.

A atividade antipirética do anacardato de sódio e compostos similares está provavelmente relacionada com o núcleo salicilico.

Mem. Inst. Butantan,
19 69-134, 1946.

BIOLOGICAL PROPERTIES OF ANACARDIC ACID (O-PENTA-DECADIENYL-SALICYLIC ACID) AND RELATED COMPOUNDS

BY F. W. EICHBAUM

(From the Department of Microbiology of the Escola Paulista de Medicina and the Department of Immunology of the Instituto Butantan, S. Paulo, Brazil)

PART IV

THE VERMICIDAL, ANTIPROTOZOIC, ANTIECTOPARASITIC AND LARVICIDAL ACTION OF ANACARDATES

A) VERMICIDAL ACTION

During our studies on the antifebrile action of the anacardates, we observed that some of the rabbits and guinea-pigs, which had received 10-20 cc of a 1% Na anac. solution per os, 1-2 days later expelled great amounts of dead worms in the faeces; this led us to a more systematic study of the vermicidal action of anacardates in vitro (*).

The worms were put into either physiologic saline (**) or Ringer solution, in shallow glass dishes, which swam in a water bath at a constant temperature level (35-37°). Various concentrations of Na anacardate were added to a measured amount of salt solution in the dishes. For each test a control dish was set up, which contained only the worms in the salt solution. Complete immobility of the worms was considered as the end point of the experiment. In some cases, the immobile worms, suspended in the anacardate solution, were washed with physiologic saline or Ringer solution and transfered to another dish, which contained only pure salt solution. Some of the worms which had been exposed to weaker concentrations of anacardate and had become immobile in it, regained their motility when the contact with the anacardate had not been too extended. The vermicidal effect of the anacardates in saline solution was

(*) As has been pointed out above, the vermicidal action of cashew nut oil has been known in popular medicine for a long time.

(**) For worms from warm blooded animals a 0.85% saline solution was used, for worms from cold blooded animals a 0.65% saline solution.

Received for publication in 16/2/46.

about twice as fast as in distilled water or 4% glucose solution, and 3-5 times as fast as in Ringer solution, where the formation of the only slightly soluble Ca salts diminishes the vermicidal power of the anacardates. These differences of vermicidal power, depending on the suspending medium, were more pronounced in certain nematodes, than in cestoids (*), from the rat intestine. The worms, after some minutes' contact with the anacardate, produced great amounts of slimy masses on their body surface; with weaker anacardate concentrations the formation of the slimy masses was less pronounced.

1. Sensitivity of nematodes (Rhabditis Fuelleborn from the frog's lung) to Sodium anacardate, added to a 0.65% saline solution:

Effect on Nematodes

Na anac concentration	
1/100 —	✠ (**) after 2-3 minutes (expulsion of the uterus)
1/10000 —	✠ after 9-10 minutes (after 1-2'. increased movements; after 5', weak movements and expulsion of the uterus).
1/100000 —	✠ after 30-40' (after 5'. increased movements; after 15', weak movements).
1/1000000 —	motile for more than 3 hours
Controls in saline solution.	motile for more than 3 hours.

The activity of Na tetrahydro-anacardate and acetylanacardic acid (emulsified with gum arabic) against Rhabditis Fuelleborn was about the same as that of Na anacardate.

2. Sensitivity of cestoids from the rat's intestine, suspended in Ringer solution, towards Na anacardate:

Na anacardate 1/1000: ✠ after 20-70 minutes (according to the size of the worms, the smaller ones being more sensitive).

Na anacardate 1/10000: ✠ after 75-130 minutes.

In comparison, a 1/4000 concentration prepared in saline solution killed the worms after 15 minutes. Stronger concentrations such as 1/100 — 1/500 killed the worms in 5 minutes or less. The worms suspended in pure Ringer

(*) For cestoids the activity of anacardates in physiol. saline solution was only 1½-2 times stronger than in Ringer solution.

(**) ✠ = dead.

solution or saline survived more than 3 hours. The results obtained with Na tetrahydro- and Na tetrabrom-anacardate were practically identical with those obtained with Na anac. The proximal parts of the worms (heads) were generally more resistant than the distal parts and ceased their motility much later than the rest of the body. Addition of horse serum, in quantities of 5%, to the Ringer-anacard solution did not diminish appreciably the vermicidal activity of the latter substance.

3. Sensitivity of ascarids towards Na anac:

In contrast to the high sensitivity of Rhabditis and the moderate sensitivity of cestoids, ascarids from swine intestine were very resistant to Na anacardate. Even in a 1% solution they became immobile only after 15-20', but a great part of them regained a slight motility after resuspension in pure saline solution. A 1/5000 dilution of Na anac in Ringer solution was without effect, even after a contact of 2½ — 3 hours. Slime formation, especially in the concentrated solutions, was very pronounced.

Systematic experiments on the vermicidal action of anacardates, *in vivo*, are in progress.

B) ACTION OF NA ANACARDATE ON PROTOZOA AND SPIRILLI

A hay infusion which had been exposed to room temperature for 3 days was distributed in a row of test tubes, to which varying amounts of Na anacardate were added. Samples were drawn from each tube in intervals of 5' and examined microscopically by the hanging drop method.

The infusion contained a great number of protozoa (ameboid forms, ciliates and fewer flagellates) as well as numerous gross spirilli (*).

Among the protozoa, the ciliates proved to be the most sensitive: they died after 10-12 minutes in a 1/30000 solution of Na anac. After a few minutes' contact with the toxic solution, refringent granulae, previously contained in the endoplasma, accumulated below the ectoplasmatic membrane, which finally ruptured and released the granulae into the surrounding fluid. Most of the ameboid forms became immobile after 10 minutes in a 1/5000 solution, but resisted the 1/30000 solution for about 1 hour. The flagellates were still more resistant; they survived in a 1/2000 solution for 20 minutes, and some individuals even 1½ hour and more.

The spirilli became immobile in a 1/3000 solution after 10-15 minutes.

(*) Since we were only interested in studying in a general way the action of anacardate on the protozoa, no attempt was made to identify the various forms in greater detail.

c) ANTI-ECTOPARASITIC ACTION OF ANACARDATE

Rabbits heavily infested with scabies (sarcoptes cuniculi), with principal localisation at the mouth parts and the paws, were treated for 2-3 days with a 5% ointment of either the raw cashew nut oil or purified Na anacardate. The result in both cases was identical: after 2-3 days, the scales fell off, and after 3-5 more days the treated parts were completely denuded of hair, exposing a clean skin. After some 10-14 more days hair again covered the treated parts (cf. photograph I-III). Animals which after the treatment had not been separated from other infested animals, caught the disease for a second time. In our experiments a 2-4 days' treatment proved sufficient, in all cases, to kill all living arthropods and their eggs. It remains to be seen, in the future, whether this sort of treatment offers any practical advantage over other approved methods. Experiments on the antiparasitic action of anacardic acid against other ectoparasites are in progress.

D) LARVICIDAL ACTION OF NA ANACARDATE

Comparative studies with DDT and Na anacardate were performed on culex larvae and pupae. Some 200 pupae and larvae were poured into a cylindrical glass vessel containing 1 liter of pond water, to which varying amounts of the Na anac solution were added. At the beginning of the experiment, all larvae and pupae, with rare exceptions, were at the surface. 2 hours after adding Na anac in a final concentration of 1/20000, all larvae disappeared from the surface either dropping immobile to the ground or remaining in the middle, without being able to attain the oxygen providing surface; after 1-2 more hours all larvae lay dead at the bottom. In higher dilutions the results differed little from the control. As in the case of DDT, the pupae proved more resistant; they survived even in stronger concentrations (1/2000) for more than 24 hours.

COMMENT

We are unable to decide, on the basis of these orientating experiments, how far the antiprotozoarian and larvicide activity of Na anacardate is due to a specific chemical action or to its high surface activity. As to the vermicidal and antiparasitic action, the high effectiveness seems to speak more in favor of a specific action of Na anacardate.

Scabies in a rabbit treated with a 5% ointment of cashew nut oil, on three subsequent days.

PHOTOGRAPH I.
Before the treatment

PHOTOGRAPH II.
1 week after the treatment

PHOTOGRAPH III
3 weeks after the treatment

ABSTRACT

In vitro experiments showed a high vermicidal activity of Sodium anacardate, Sodium tetrahidro-anacardate and acetylanacardic acid. Rhabditis Fuelleborn (Nematodes) died within 30′ in a 1/100000 solution; cestoids (from the rat intestine) in 1/4000 solution after 15′; ascarids (from the swine intestine) only in a 1/100 sol. after 15′, surviving in a 1/5000 solution for more than 2½ hours. These values refer to dilutions made up with physiologic saline solution. In Ringer solution the activity was 2-5 times weaker. Anthelmintic effects *in vivo* could be observed in rats, guinea pigs and rabbits, which received orally the substances mentioned.

Protozoa from a hay infusion showed a varying degree of sensitiveness to Na anacardate: ciliates died under granular desintegration within 10-12′ in a 1/30000 solution; ameboid forms became immobile after 10′ in a 1/5000 solution, some flagellates in a 1/3000 solution after 20′; others survived in the same solution for more than 1½hours.

Larvae of culicidae were killed within 2 hours by a 1/20000 solution of Na anacardate.

Rabbits heavily infested with scabies were cured by local application of a 5% ointment of either raw cashew nut oil or Sodium anacardate. Transitory loss of hair occured in the treated parts (*).

RESUMO

O anacardato e o tetrahidroanacardato de sódio bem como o ácido acetilanacárdico, mostraram-se altamente vermicidas *in vitro*. Rhabiditis Fuelleborn (Nematodios) morreram dentro de 30′ em uma solução 1/100 000; cestódios (do intestino do rato), em 15′ em solução a 1/4 000 e áscaris (do intestino de porco), só morreram em solução a 1/100, depois de 15′; êstes últimos sobreviveram por mais de 2½ horas em uma solução a 1/5 000. Todos os valores se

(*) Note. Only after finishing these studies did we learn from a recent paper by Rogers, that detergents like Na oleate and laurate not only increase the anthelmintic activity of hexylresorcinol, but that they possess also by themselves some vermicidal activity against Nippostrongylus muris (cf. W. P. Rogers. Studies on the anthelmintic activity of hexylresorcinol and tetrachlorethylene. *Parasitology*, 36(1-2): 98-109, Sept. 1945).

referem a diluições com solução fisiológica de cloreto de sódio. Usando-se solução de Ringer, a atividade decresce 2 a 5 vêzes. *In vivo* foram observados efeitos anti-helmínticos em ratos, cobaias e coelhos após administrações orais das substâncias referidas.

Os protozoários de uma infusão de feno mostraram um grau variável de sensibilidade ao anacardato de sódio: os ciliados morreram com desintegração granular dentro de 10′, em uma diluição a 1/30 000; as fórmas amebóides tornaram-se imóveis depois de 10′ em uma diluição a 1/5 000 e alguns flagelados, depois de 20′, em uma diluição a 1/3000; outros sobreviveram na mesma solução por mais de 1½ horas. Larvas de culicideos morreram dentro de 2 horas em uma diluição a 1/20 000 de anacardato de sódio.

Coelhos, muito infestados com sarna, curaram-se com a aplicação local de um unguento a 5% de óleo de cajú crú ou de anacardato de sódio. Foi observada a queda temporária do pelo nas áreas tratadas.

Mem. Inst. Butantan, 19:69-134, 1946.

BIOLOGICAL PROPERTIES OF ANACARDIC ACID (O-PENTA-DECADIENYL-SALICYLIC ACID) AND RELATED COMPOUNDS

BY F. W. EICHBAUM

(From the Department of Microbiology of the Escola Paulista de Medicina and the Department of Immunology of the Instituto Butantan, S. Paulo, Brazil)

PART V

TOXICOLOGY OF ANACARDIC ACID AND RELATED COMPOUNDS
CLINICAL OUTLOOK

Sodium anacardate, dissolved in physiologic saline solution, has a strong hemolytic activity; it hemolyses in concentrations up to 1/25000-50000 a 5% suspension of sheep blood-cells within 1 hour at 37°. The presence of inactivated horse serum (10% of total liquid) lowers the hemolytic activity to about 1/500. Leucocytes appeared much more resistant, since a 1/100 solution of Na anac in the presence of 10% serum provokes only a slight deformation of living leucocytes which produce under the influence of this substance, pseudopodium-like protrusions. Their phagocytic power against staphylococci and streptococci is not impaired but seems, on the contrary, even slightly enhanced, as has been observed similarly with soap solutions (Sollmann). Leucocytes in a 1% Na anac solution without the presence of serum, however, are cytolized immediately.

Another *in vitro* phenomenon, worthy of mention, is the inhibition of the specific agglutination of typhoid bacilli by an antityphoid serum, in the presence of Na anacardate:

Received for publication in 16/2/46.

Antityphoid serum (titer 1/2560)	Na anac.	Suspension of Typhoid bac.	Agglutination after 1 hour at 37°
Dilution 1/640 0.25 cc	1/100 0.25 cc	0.5 cc	+
1/640 0.25 cc	1/200 0.25 cc	0.5 cc	0
1/640 0.25 cc	1/400 0.25 cc	0.5 cc	0
1/640 0.25 cc	1/800 0.25 cc	0.5 cc	0
1/640 0.25 cc	1/1600 0.25 cc	0.5 cc	0
1/640 0.25 cc	1/3200 0.25 cc	0.5 cc	0
1/640 0.25 cc	1/6400 0.25 cc	0.5 cc	++
1/640 0.25 cc	1/12800 0.25 cc	0.5 cc	++++
1/640 0.25 cc	1/25600 0.25 cc	0.5 cc	++++
1/640 0.25 cc	Phys. NaCl 0.25 cc	0.5 cc	++++
Physiol. saline 0.25 cc	Na anac. 1/100 0.25 cc	0.5 cc	+ - ++
Physiol. saline 0.25 cc	1/200 0.25 cc	0.5 cc	±
Physiol. saline 0.25 cc	1/400 0.25 cc	0.5 cc	0

Result — Whereas stronger anacardate solutions (1/100), mixed with bacteria, cause a weak agglutination by themselves, the higher dilutions up to 1/3200 inhibit the agglutinating power of antityphoid serum. In a similar way, the precipitation of the carbohydrate from type II pneumococci by a specific serum is inhibited in the presence of small amounts of Na anacardate. This phenomenon, like the action of anacardates on erythrocytes and leucocytes, must be attributed, in our opinion, to the high surface activity of the substance in te

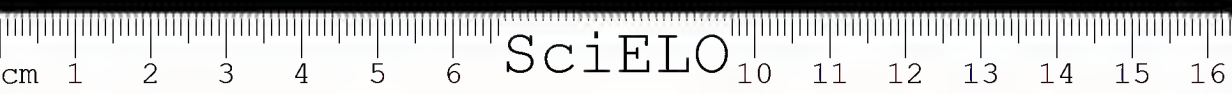
Toxicologic experiments in animals — Oral application of anacardic acid and derivatives caused no systemic alterations in guinea pigs, rabbits or dogs. The daily doses varied from 0.07-0.2 g per kg body weight. Time of administration 1-14 days. In some animals which had been killed 1-2 days after the intake of 20 cc of a 1 or 2% solution of Na anac, we noticed a slight hyperemia of the gastric mucosa and occasionally even small petechial hemorrhages at the minor curvature. Liver and kidneys showed macroscopically no notable changes. The chronic oral administration of 20 cc of a 1% Na anacardate or Na tetrahydro-anacardate solution produced in some rabbits and guinea pigs diarrheic evacuation with expulsion of dead worms. The subcutaneous injection of a 1% solution caused, after 3-4 days, a sterile necrosis which healed completely after 10-12 days. 0.1-0.2% solutions were supported without marked macroscopical lesions. 1% solutions of Na anacardate in an oily vehicle did cause only slight local and no general symptoms, even when applied twice a week for 2 months or more (in rats). The intraperitoneal injection of 1% solutions of Na anacardate acetyl anacardate, Na tetrahydro-anacardate and the ethyl ester of anacardic acid (10 cc

in guinea pigs, 20 cc in rabbits) provoked the formation of a sero-fibrinous peritonitis, which caused the death of some animals 24-48 hours after the injection. In rabbits, the local symptoms were generally more pronounced than in guinea pigs. 1°/₀₀ solutions, intraperitoneally, were supported without significant local irritation.

Intravenous (or intracardial) injection of 1-2 cc of a 1% Na anacardate solution in guinea pigs killed the animals within a few seconds, with the symptoms of an anaphylactoid shock (unrest, sneezing, panting dyspnea, clonic convulsions). The lungs showed a well developed emphysema, only rarely subpleural petechia. 5-10 cc of a 1% Na anac solution, slowly injected into the ear-vein of rabbits, caused in some of the animals unrest, dyspnea and lassitude which disappeared after some 30′: only in exceptional cases, when the injection was made rather rapidly, the rabbits died in shock with opisthotonos and clonic convulsions. The injection of a 1% Sodium anacardate solution into the ear vein of rabbits caused in a number of cases a thrombosis of the vessel and sometimes even a sterile necrosis of the surrounding tissue. Pigeons supported the intravenous injection of 1 cc of a 1% Na anac solution without special symptoms, whereas higher concentrations (2.5-5%) killed the animals after 3-5 minutes, with symptoms not unlike those provoked by neurotoxic snake venoms (e.g. *Bothrops jararaca*): opisthotonos, clonic convulsions.

The instillation of a 1% Na anac solution into the conjunctival sack of rabbits did not reveal any irritating action during an observation time of 24 hours. The instillation of a 0.2-1% solution of Na anac into the male urethra caused a burning sensation of varying intensity in various individuals tested. While some of them supported even 1% solutions without greater discomfort, others did not support a solution 4 times as weak complaining of an intolerable burning sensation. 1-2 per mil solutions were, generally, inoffensive for all subjects tested.

Whereas the fur of rabbits and guinea pigs loses its hair temporarily, following the topical application of a 2-5% ointment of anacardic acid or crude cashew oil, no local depilatory action could be observed in man. 1-5% ointments or solutions (in water or alcohol) applied to the intact skin of the shank for 48 hours did not cause any irritation, whereas in open wounds they sometimes provoked a burning sensation of varying intensity.

The high bactericidal activity of the anacardates against gram-positive germs and Neisseria stimulated a clinical trial of these substances in cases of sulfanilamide or penicillin-resistant specific and non-specific urethritis. We treated some 30 of these cases in collaboration with Dr. Hidal of the Urologic Outpatients Department of the Escola Paulista de Medicina, São Paulo. In

numerous cases, which were treated topically with instillations of 0.2-0.5% Na anac solutions, we achieved very satisfactory results (photog. 1, 2), whereas other cases — especially chronic gonorrhea with prostatitis — proved refractory to the treatment. Further details will be published elsewhere.

In the local treatment of pyogenic infections also, these substances appeared to have a beneficial effect. These studies are being continued.

In connection with the claimed antileprotic activity of cashew nut oil (Lima, Hansen and Looft; Morais) we have also started therapeutic experiments on rats infected with Stefansky's bacillus.

ABSTRACT

Sodium anacardate has a strong hemolytic activity, which is reduced considerably in the presence of serum. Leucocytes are less sensitive to the cytolyzing activity of Sodium anacardate.

The agglutination of typhoid bacilly and the precipitation of the pneumococcus II carbohydrate by specific serum are abolished in the presence of Na anacardate. The high surface activity of Na anacardate seems important for the phenomena described.

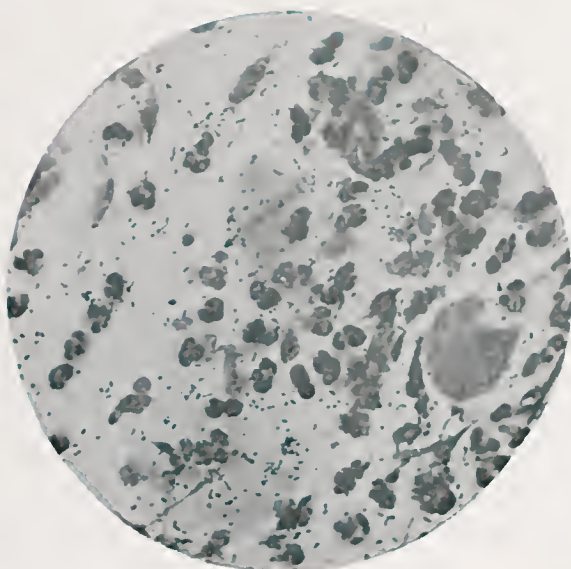
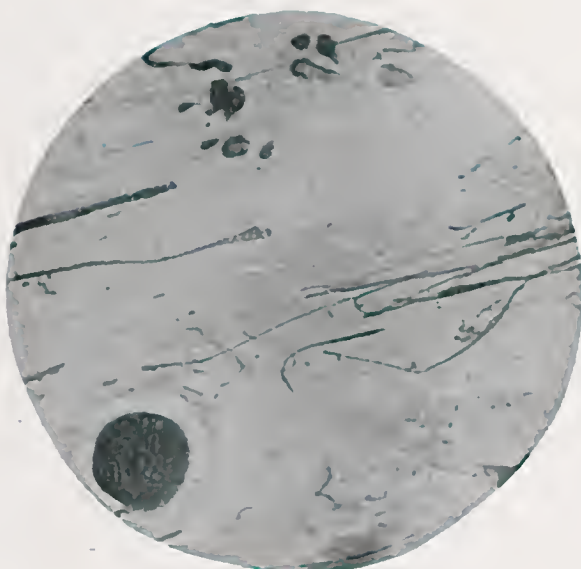
Na anacardate and related compounds do not produce any systemic lesion when given by oral route. Intravenous injections in concentrations of 1/100 and more produce deadly anaphylactoid shock in guinea pigs and pigeons. Subcutaneous injection of 1% solutions cause sterile necrosis. Oily solutions in the same concentration are well supported.

1-5% ointments produced in rabbits transitory loss of hair; this local effect was not observed in human subjects.

Intraurethral instillations of a 0.2% solution of Na anac are generally well supported. Preliminary experiments on the local treatment of specific and unspecific urethritis and other pyogenic infections gave encouraging results.

RESUMO

O anacardato de sódio tem uma forte ação hemolitica, que é reduzida consideravelmente na presença de sôro. Os leucocitos são menos sensiveis à ação citolítica do anacardato de sódio.

Mem. Inst. Butantan,
19 :99-134, 1946.

PHOTOGRAPH I — 900 x — Before treatment. — Smear from a non-gonorrhoic, chronical, sulfanilamide-resistant urethritis, containing numerous enterococcus-like and diphtheroid germs.

PHOTOGRAPH II — 900 x — 24 hours after local treatment with a 1/2 % Na anacardate solution (twice in a 12 hour's interval). The leucocytes have disappeared almost entirely; visible only fibrin threads, few epithelial cells and isolated germs.

A aglutinação dos bacilos tificos e a precipitação do carbohidrato do pneumococo II pelos sôros especificos são abolidos na presença do anacardato de sódio. A grande atividade de superficie do anacardato de sódio parece importante em tais fenômenos.

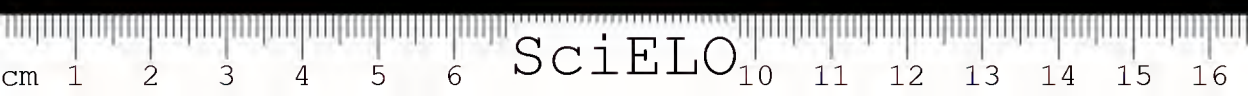
O anacardato de sódio e produtos relacionados, quando administrados por via oral não produzem qualquer lesão do organismo. A injeção intravenosa em cobaios ou pombos, na concentração de 1:100 ou mais, produz um choque anafilatóide mortal. Soluções a 1%, injetadas subcutaneamente, produzem necrose esteril; soluções oleosas, na mesma concentração, são bem suportadas.

Unguentos a 1-5% produzem no coelho queda de pêlo nas partes tratadas. Este efeito não foi observado no homem.

Instilações intrauretrais de soluções a 0.2 % de anacardato de sodio são geralmente bem toleradas. Experiencias preliminares no tratamento de uretritis especificas ou inespecificas e de outras infeções piogenicas, deram resultados encorajadores.

REFERENCES

1. *Hansen, G. A. & Looft, C.* Leprosy in its clinical and pathological aspects. Chapter VIII "Treatment", Bristol, 1895.
2. *Lima, A.* Tratamento da Lepra. *Brasil Medico*, 9(4):25-28, 1895.
3. *Morais, M. O.* O oleo de cajú na lepra, *Rev. Brasil. de Farm.*, 26:17-20, 1945.
4. *Sollmann, T. H.* A Manual of Pharmacology. Philadelphia and London, 1942, 6th ed., Saunders Co.

Mem. Inst. Butantan,
19:135-158, 1946.

NOVIDADES SISTEMÁTICAS NA ORDEM *SCOLOPENDROMORPHA*

POR WOLFGANG BUECHERL

(Do Laboratório de Zoologia Médica do Instituto Butantan, São Paulo, Brasil)

Genus Scolopendra L., 1758

Scolopendra morsitans amazonica, subsp. n. (Figs. 1, 2 e 3)

Medidas — 65 a 76 mm de comprimento (sem antenas e últimas pernas).

Placa cefálica	5.0 mm compr.	4,3 mm largura
1.º tergito		6.0 mm largura
2.º tergito		4,5 mm largura
3.º tergito		4.0 mm largura
4.º tergito		4.3 mm largura
5.º tergito		4.4 mm largura
10.º tergito		5.0 mm largura
15.º tergito		5,4 mm largura
19.º tergito		5.3 mm largura
20.º tergito		6.0 mm largura
21.º tergito	3,8 mm compr.	4.8 mm largura
21.º esternito	2.5 mm compr.	2.5 mm largura
na borda anterior		1.3 mm largura
(diâmetro da borda posterior curva)		
Campo poroso	4,0 mm compr.	1.4 mm largura
na parte posterior, mais larga		0.5 mm largura
na parte anterior		0.2 mm largura
Borda posterior das coxopleuras		3.0 mm largura
21.º par de pernas — prefêmur	5,0 mm compr.	1.4 mm largura
fêmur	4,0 mm compr.	1.2 mm largura
tíbia	3.0 mm compr.	1.0 mm largura
tarso I	1.8 mm compr.	0.8 mm largura
tarso II	1,0 mm compr.	

Entregue para publicação em 28 de março de 1946.

As medidas acima formam a média entre 5 exemplares medidos.

A *Scolopendra morsitans*, infelizmente, nunca foi descrita por nenhum do- numerosos autores que dela trataram, com as medidas minuciosas. Attems ape- nas relata: "Comprimento até 120 mm — portanto, quase o dobro de *amazo- nica*: relação entre 10:1 até 15:1". Em *amazonica*, entretanto, esta relação nã- pode ser expressa, simplesmente pelo fato de seu tronco não ser paralelo com em *morsitans*, mas por aumentar em largura, tanto nos machos como nas fê- meas, a começar do segundo tergito, atingindo êste aumento o máximo no 20. tergito.

Colorido — Enquanto que em *Scolopendra morsitans* observamos um colo- rido muito variável amarelo-marrom ou côr de castanha escura ou verde escu- ou cabeça e 1.º tergito vermelho-marrom, 2.º ao 20.º tergito com zona mediana ama- rela, com faixa verde nas margens anterior e posterior ou cabeça e 1.º tergi- marron claro, os outros tergitos côr de oliva verde ou tergitos amarelo escuro com uma faixa larga verde entre os dois sulcos medianos — êste colorido s- apresenta em *morsitans amazonica* com grande uniformidade em todos os exem- plares vistos: patas, antenas e esternitos amarelos: placa cefálica, primei- segmento de patas ambulatórias e 21º segmento, inclusive pernas de côr marro- avermelhado; tergitos amarelo marrom, com faixa verde escura na borda pos- terior dos tergitos 2-20.

O colorido, portanto, é bem constante em *amazonica*.

Placa cefálica sem sulcos, com pontuações muito esparsas.

Antenas com 20 articulos, dos quai os primeiros 6 não apresentam pêlos o sétimo já é piloso mesmo nas partes basais. Em *Scolopendra morsitans* número de articulações antenais é muito variável — de 17 a 23 articulos, com a 9 articulos basais sem pêlos.

Tergitos com sulcos paramedianos desde o 3º até ao 20º. 2º tergito já com sulcos curtos na borda anterior, muito leves e quase imperceptíveis. Além d- sulcos paramedianos os mesmos tergitos apresentam um curto sulco mediano margem posterior, ausente em *morsitans*. Carenas laterais bastante variáveis exemplar em exemplar, principiando num no 8º tergito, noutro no 10º, no tercei- no 11º, no quarto no 12º e no quinto no 14º tergito, mas sempre inacabadas pouco salientes, atingindo a borda posterior da placa somente nos 2 últim- tergitos. Nos primeiros tergitos carenados as carenas laterais também n- atingem a borda anterior das placas. Último tergito sempre com sulco median- completo, às vêzes ausente em *morsitans morsitans*.

Coxosternum forcipular (Fig. 1) sempre sem sulcos horizontal ou longi- tudinal; com sulcos basais meio curvos, mas não se afastando muito de um

reta. Placas dentarias um pouco mais largas que longas, sempre com 5 dentes em cada placa, sendo os dois externos isolados e os três internos reunidos num bloco.

Esternitos 2 a 20 com dois sulcos longitudinais, que atingem a borda posterior, mesmo nos últimos esternitos; em *morsitans morsitans* os sulcos são abreviados nos últimos segmentos. 21.º esternito sem sulco, com borda posterior arqueada e com uma depressão sub-redonda na placa.

Patas 1 a 19 com 1 esporão tarsal; 1.º par sempre com 1 só, enquanto que em *morsitans morsitans* às vêzes existem 2 esporões; 20.º par sempre sem esporão, em *morsitans morsitans* com ou sem esporão.

Coxopleuras do 21.º segmento (Fig. 2) com campo poroso muito menor do que em *morsitans morsitans*, isto é, não atingindo nem a metade da zona entre o tergito e o esternito e também não alcançando a borda posterior (vide Fig. 2). No meio das coxopleuras, na borda posterior, existe em *morsitans amazonica* subsp. n. uma fossa mediana posterior, abaixo da qual se encontra 1 espinho (Seitendorn). Apêndice coxopleural muito curto e obtuso, quase não saliente (apenas a metade do comprimento do mesmo apêndice de *morsitans morsitans*) e terminando em 4 espinhos pequenos (sempre 4 em todos os exemplares) em *morsitans morsitans* 3 — 5 espinhos.

Morfologia das últimas patas dos machos e das fêmeas veja um trabalho do A. em Memórias do Instituto Butantan, **16**: 37-68,1942. 21º prefêmur (Figs. 2 e 3) com filas longitudinais ventrais (Fig. 2), de 3 espinhos, sempre de posição certa; no lado dorsal interno sempre com 5 espinhos, igualmente de posição certa em todos os exemplares (em *morsitans morsitans* 4-6 espinhos).

Anomalia — Num macho de *S. morsitans amazonica*, subsp. n. (No. 243 da coleção quilopódica do Instituto) existe uma pata de formação anômala, com 14 espinhos dorso-internos e do canto, aglomerados a esmo.

Espinho do canto ("Eckdorn") longo, cilíndrico, sempre com 4 espinhos; em *morsitans morsitans* com 3 - 8 espinhos.

Embora a espécie, *Scolopendra morsitans*, descrita já por Linneu e depois dêle por inúmeros especialistas, tenha sua existência assinalada em todos os países tropicais e subtropicais, as fórmas que serviram para o diagnóstico morfológico desta espécie quase sempre provinham da Africa do Norte, de Tunis, da Algéria, de Marrocos e da região de Constantinopla. Mesmo êstes exemplares, embora provindos de uma região mais ou menos contínua, apresentam variações morfológicas muito extensas: dai a grande variação na descrição dos caractéres morfológicos de *morsitans morsitans*.

Em oposição a isto temos a *morsitans amazonica,* subsp. n., cujos caracté-res, de uma maneira geral, são extremamente constantes, sem a flutuação de *morsitans morsitans.*

Como caractéres novos *amazonica,* subsp. n., apresenta, antes de tudo, a conformação morfológica das coxopleuras, do campo poroso, do espinho lateral, além da constância nos outros caractéres, principalmente no colorido.

A variedade *S. m.* var. *scopoliana* C. L. Koch. de Algeria, Tunis e Marrocos, não representa uma variedade nitidamente separada de *morsitans morsitans.*

Tipo: No. 241 da coleção quilopódica do Instituto Butantan. Macho.

Paratipos: 2 fêmeas e 2 machos, sob Nos. 242-244 da mesma coleção.

Local-tipo: Arredores de Manaos-Amazonas.

O grupo Scolopenda viridicornis Newp., 1844

Já em trabalhos anteriores tivemos oportunidade de salientar que a escolopendra *viridicornis* é o escolopendrideo mais frequênte no Brasil e, ao mesmo tempo, ao lado de *Scolopendra subspinipes subspinipes,* o de maior porte, pois chega a atingir o tamanho de 200 mm. Vimos mesmo já dois exemplares de 22 e 24 cm de comprimento, em coleções nacionais, tendo sido êstes exemplares classificados como sendo *Scolopendra gigantea* L.

De fato a *Scolopendra gigantea* só se distingue de *viridicornis* pelo maior comprimento (até 265 mm.), pelo maior número de articulos basais das antenas desprovidos de pelos (9-12) e pelo maior número de espinhos no apêndice coxopleural (4-9) e no "espinho do canto" (Eckdorn) do último prefemur (6-8). Tôdas as outras caracteristicas morfológicas (número de articulos antenais; número de dentes; sulcos episcutais e nos esternitos; aspecto morfológico do último tergito; carenas laterais; espinhos dorsais nos prefêmures das pernas) são extremamente variáveis, de maneira tal que, confrontando-se grande número de animais, nota-se que as duas espécies se confundem. Isto vale mesmo no tocante à formação morfológica do espinho do canto e do apêndice coxopleural. Restaria, pois, apenas um único caracteristico, pois não se pode tomar em conta a diferença de comprimento — o do maior número de articulos antenais basais sem pêlos (9-12 em *gigantea,* 4 apenas em *viridicornis*).

Sôbre êste último caracteristico não podemos emitir uma apreciação exata, pela simples razão de nunca termos visto uma *Scolopendra gigantea,* ainda que tenhamos examinado material quilopódico de todo o Brasil e de algu-

países vizinhos. Dois exemplares, encontrados em coleções com os nomes de *gigantea* (classificação atribuida á Broelemann) revelaram possuir todos os caracteristicos de *viridicornis*.

Aliás, temos na coleção do Instituto Butantan exemplares de *viridicornis*, com 6-10 articulos basais antenais sem pêlos. Um exame, porém, mais acurado demonstra tratar-se de exemplares com perda artificial de pêlo, seja pela idade, seja pelo habitat (debaixo de pedras, em tócas estreitas), seja pelos hábitos biológicos (as antenas são órgãos táteis em continuo movimento, apalpando sempre o caminho), etc..

Após as refeições a escolopendra submete as antenas a uma limpeza cuidadosa escovando articulo por articulo com a escova de pêlos, existente nos maxilares — afazeres êstes que duram bastante tempo e podem muito bem ser apreciados em animais cativos.

Restaria, pois, verificar os mesmos fatores em *gigantea*, mas infelizmente não sabemos do paradeiro do tipo nem de paratipos. Em todo o caso existe a suspeita fundada de uma possível identidade destas duas espécies ou pelo menos entre a *viridicornis viridicornis* Newp. e a *gigantea* L. Neste caso prevaleceria o nome de *gigantea*, por ser mais antigo.

Aliás, após o confronto morfológico de centenas de exemplares de *viridicornis* e o estabelecimento objetivo de todos os caracteres de fato aproveitáveis e constantes, chegamos à conclusão que a espécie *viridicornis* deve ser subdividida em três subespécies:

viridicornis viridicornis Newport,
viridicornis nigra Bücherl,
viridicornis spinipriva, subsp. n.

Embora em trabalhos anteriores já tivessemos tratado, por alto, dêste assunto, descrevendo a *nigra*, queremos, contudo, redescrever as duas subespécies e descrever a última, aqui apresentada como nova.

Scolopendra viridicornis Newp., 1844

Medidas: comprimento até 224 mm (com antenas e últimas patas) e até 176 mm (sem antenas e últimas patas).

Há exemplares bem maiores ainda, mas são muito raros.

Antenas 26 - 32 mm compr. 21° par de pernas 21 - 25,3 mm compr.

Comprimento dos artículos das últimas patas: prefemur 8 mm; femur 6,4 mm; tibia 4,6 mm; 1º tarso 3,2 mm; 2º tarso 1,6 mm; garra 1,9 mm.

Largura:	lado basal	lado terminal
prefemur	3 mm	3 mm
femur	2,4 mm	2,4 mm
tíbia	2 mm	2 mm
tarso 1	1,6 mm	1,2 mm
tarso 2	1 mm	0,8 mm

Espinho do canto 1,2 mm compr.; 0,8 mm largura na base; 0,6 mm largura na ponta.

Apêndice coxopleural (medidas a começar onde termina a área porosa): comprimento ventral 1.2 mm; lateral 0,8 mm; largura na base 0,6 mm, na ponta terminal 0. 45 mm.

21º esternito:		
	comprimento nas bordas laterais	3,0 mm
	comprimento no meio	3,8 mm
	largura anterior	3,2 mm
	largura posterior (diâmetro)	1,9 mm

Colorido: verde claro ou escuro nas antenas, principalmente nos 4 artículos basais. Nos demais artículos existem pêlos amarelo claros sôbre fundo esverdeado; uma faixa transversal, paralela à borda posterior dos tergitos 3-20 (pode ser tão palida que parece cinza); as tíbias e os primeiros tarsos, principalmente das pernas 20, 19 e 18, onde o verde é muito vivo, empalidecendo progressivamente nas pernas anteriores. (O verde desaparece muito depressa, quando os animais são conservados em alcool a 70%, cedendo logar ao amarelo pálido)

Cór castanha — placa cefálica, coxosternum forcipular, 1º tergito, último tergito com as coxopleuras e o campo poroso; prefemur e femur das últimas pernas.

Cinza escura — tíbia, 1º tarso e porção apical do 2º tarso das últimas pernas.

Amarela (clara ou acinzentada) — esternitos, pernas e tergitos (êstes com uma leve tonalidade marrom em exemplares idosos, enquanto que nos filhotes e adolescentes os tergitos são amarelo claros).

Existe uma variação no colorido de *viridicornis viridicornis*, ainda que não frequênte: placa cefálica, 1º tergito e todos os outros tergitos até ao 20º marrom escuro, com bordas posteriores quase pretas. Coxosternum forcipular, 21º tergito, coxopleuras e campo poroso, 21º prefemur e femur vermelho tijolo: vigesima primeira tíbia e tarsos amarelos com manchas escuras, verdolengas.

Cabeça com 2 sulcos longitudinais, divergentes, formando pequenos circulos atrás e dissolvidos na borda posterior num grande número de sulcos horizontais. Antenas com 17 artículos, sendo 3 artículos basais inteiramente desprovidos de pêlos e o 4º desprovido de pêlos no lado basal, piloso apenas na margem interna terminal. Dentes 4 + 4 (raríssimas vezes num lado 5), sendo isolado apenas o externo, enquanto que os tres internos são sempre reunidos, mais ou menos, num bloco só. Abaixo do 2º dente existe uma cerda, nascida em um tubérculo, que está no meio de uma cavidade arredondada. Coxosternum forcipular com sulco mediano e sulco horizontal e dois sulcos laterais. Os 2 últimos formam a continuação dos sulcos basais das placas dentárias. O sulco mediano longitudinal pode ou não atingir o sulco horizontal. Êste é inteiro ou interrompido no meio, desfazendo-se em sulcozinhos. Os sulcos laterais raras vezes atingem o sulco horizontal (Vide Fig. 4).

1º tergito com fossa curva, às vezes quase totalmente coberta pela placa cefálica, porém, em geral, toda à vista e ainda com uma área anterior livre. Com 2 sulcos longitudinais (Vide Fig. 5) paralelos, que se bifurcam na frente, perdendo-se o ramo externo nos cantos anteriores do tergito e prolongando-se os ramos internos até a fossa curva, que é, muitas vezes, ultrapassada pelos sulcos. Os 2 ramos internos, antes de atingirem a fossa, são unidos por um leve ramo horizontal (Fig. 5), só ausente raras vezes. Atrás os 2 sulcos horizontais não se bifurcam em, mais ou menos, 70%; há bifurcação de 1 ramo só em 20%; há bifurcação dos 2 em 10% dos exemplares (base para êste calculo — 95 exemplares).

A configuração dos sulcos do 1º tergito é igual nos machos e nas fêmeas e também nas formas jovens (foram confrontados perto de 30 jovens). 2º tergito sem sulcos longitudinais; 3º com sulcos longitudinais, sempre bifurcados na frente; 4º até ao 20º tergito com 2 sulcos longitudinais simples, ou no 4º, às vezes, ainda ligeiramente bifurcados na frente. Último tergito (Fig. 6) com *quilha mediana* muito elevada em 95% (125 exemplares confrontados). Quilha mais estreita na frente; no meio quase o dobro da largura anterior. Quase sempre com um sulco longitudinal mediano, no meio da quilha (em 80%). Áreas laterais da quilha sempre elevadas, com ou sem rugosidades ou tuberculos. Apenas em 7% dos exemplares confrontados as áreas laterais são lisas e quase não elevadas. Carenas laterais desde o 3º ou 6º tergito.

Esternitos com 2 sulcos longitudinais paralelos, percorrendo todo o comprimento das placas. Último esternito com bordas laterais convergentes e borda posterior arqueada; com depressão longitudinal no meio da placa. Borda posterior com ligeira diferença morfológica nos machos e nas fêmeas (caráter constante), isto é, nas fêmeas a curva é normal e mais acentuada, enquanto que

nos machos ela é mais aberta e além disso ligeiramente bilobada. Isto encontra sua explicação no fato de os órgãos sexuais dos machos, quando protraidos, se apoiarem sôbre a borda posterior do último esternito.

1º par de pernas com 1 esporão na borda distal ventral do prefemur, do femur e da tíbia e com 2 esporões no 1º tarso. Isto em todos os exemplares. Sem nenhum espinho no lado dorsal distal do prefemur; 2º até ao 20º par de pernas com 1 esporão no 1º tarso; no lado dorsal do prefemur das mesmas pernas, na borda terminal, com O - muitos espinhos, geralmente com 2 espinhos nas pernas 2-5; com 0-1 espinho nas pernas 6-9; com 2 espinhos novamente nas pernas 10 - 20. No 20º par há ainda, geralmente, um espinho na parte dorso medial.

Aliás o número de espinhos no lado dorsal apical do prefemur das pernas varia de indivíduo em indivíduo, de maneira que não é licito, como fizeram Attems e Verhoeff e ainda Broelemann e Chamberlin, aproveitá-los como caracteristicos especificos. Num futuro trabalho, de natureza estatística, vamos nos referir a êste ponto.

Coxopleuras do 21º segmento com poros um tanto separados, muito numerosos. Apófises coxopleurais cilíndricas (Fig. 7), relativamente longas; na ponta com 1-4 espinhos, alguns maiores e curvos; às vêzes num lado 2, no outro 3 ou 4 espinhos; raras vêzes apenas 1 em cada lado, geralmente 3 de cada lado. 21º par de pernas com prefêmur munido de espinhos robustos, às vêzes nascidos em protuberâncias quitinosas. Espinhos maiores sempre curvos para traz. Número de espinhos geralmente 11 de cada lado, podendo ocorrer uma diferença por 1 ou 2 em cada pata (aliás as anomalias aqui são bem frequêntes). Na maioria dos exemplares observa-se uma certa regularidade na disposição dêstes espinhos, a saber: no lado ventral 3 filas de 2 espinhos cada (quase equidistantes), sendo os espinhos da fila do meio um pouco mais avançados para a frente; no lado interno 1 espinho só (havendo 13 espinhos no total, existem 3 no lado interno); no lado dorso interno 2 filas de 2 espinhos cada.

Espinho do canto ("Eckdorn"), longo, cilíndrico, com 2-5 espinhos na ponta, geralmente 3 - 4, sendo os últimos os maiores e curvos.

Nota: Para a presente redescrição foram confrontados perto de 150 exemplares desta mesma subespécie, provenientes principalmente dos Estados de Santa Catarina, Paraná, Rio Grande do Sul, Mato Grosso e Rio de Janeiro, e, alguns, do Amazonas e Pará.

Scolopendra viridicornis nigra Buecherl

Medidas: 103,5 mm de comprimento (sem antenas e pernas) ou ainda menores; esta subespécie é, portanto, muito menor do que a precedente. As outras medidas não são características, de maneira que prescindimos de nos refe-

tir a elas. Apenas os tergitos são muito mais largos do que longos, apresentando as seguintes dimensões:

	comprimento	largura
1.º tergito	4.5 mm	6,5 mm
2.º "	1,5 mm	5,7 mm
3.º "	4.5 mm	6,3 mm
4.º "	3,5 mm	6,4 mm
5.º "	5,5 mm	6,6 mm
6.º "	3.5 mm	6,6 mm
7.º "	5,0 mm	6,7 mm
8.º "	5,0 mm	6,8 mm
9.º "	3,5 mm	7,3 mm
10.º "	5,0 mm	7,8 mm
11.º "	4,0 mm	7,9 mm
12.º "	6,0 mm	8,1 mm
13.º "	6,0 mm	8,1 mm
14.º "	7,0 mm	8,2 mm
15.º "	5,0 mm	8,2 mm
16.º "	6.0 mm	8,1 mm
17.º "	5,0 mm	8,0 mm
18.º "	6,0 mm	7,9 mm
19.º "	5,0 mm	7,8 mm
20.º "	6,0 mm	7,9 mm
21.º "	5,5 mm	

(Base para a medição: seis exemplares adultos).

Colorido: Cabeça, 1º segmento do tronco e 21º segmento côr de tijolo; antenas e patas amarelas (1º tarso e uma parte do 2º tarso e, às vêzes, também, uma parte da tibia, não raras vêzes esverdeados); esternitos amarelo claros; tergitos 2 a 20 com a primeira metade ou quase dois terços anteriores da placa *escuros, quase pretos* (Vide nomen) e com a borda posterior amarela, *nunca verde ou escura* como em *viridicornis viridicornis*. *O colorido dos tergitos é sempre constante e fórma assim um dos melhores caractéres subespecíficos de nigra*, em oposição a *viridicornis viridicornis*, para a qual também é constante a *ausência do colorido preto* na metade anterior dos tergitos.

Número de artículos antenais: número de artículos antenais basais sem pêlos; número e posição dos dentes forcipulares; configuração dos sulcos no coxosternum forcipular; sulcos paramedianos e carenas laterais dos tergitos; sulcos longitudinais dos esternitos — iguais a *viridicornis viridicornis*, com exceção dos sulcos no 1º e no 3º tergito.

Os sulcos já da placa cefálica e ainda mais os do 1º tergito são em *v. nigra* muito mais nítidos do que em *v. viridicornis*, onde, às vêzes, são quase invisíveis. Os 2 sulcos do 1º tergito são sempre bipartidos em frente *e atrás* (atrás

às vêzes apenas 1 é bipartido), porém o ramo interno da bifurcação anterior nã
se une por um sulco transversal ao ramo da outra metade, mas, quase sempre
se extende além da fossa transversal curva (Fig. 8).

Sulgos longitudinais do 3º tergito simples, não bipartidos em frente, com
em *v. viridicornis* (Fig. 8).

Último segmento: a) *esternito* com bordas laterais e impressão mediana com
em *v. viridicornis*, porém, com borda posterior muito mais truncada, não tão ar
queada, na maioria dos casos quase reta, até mesmo nas fêmeas (Fig. 9); b
campos porosos mais estreitos em *v. nigra* do que em *v. viridicornis*, com por
muito menores e mais unidos do que na última; c) *apêndice coxopleural* ("Coxo
pleurenanhang") muito pouco saliente, curto, *cônico*, isto é, com base grossa e
terminando em fórma de cone curto, truncado na ponta (Fig. 9). Número de
espinhos como em *v. viridicornis*, ainda que menores em tamanho; d) tergito com
quilha mediana da mesma espessura atrás do que na frente; sempre sem fos
mediana; quase nunca com tuberculos laterais (Fig. 10); e) *últimas pernas* —
espinho do canto ("Eckdorn") da mesma estrutura morfológica como o apênd
coxopleural, isto é, curto, cônico, com base larga, enquanto que em *v. viri
cornis* estas duas apófises são, como vimos, longas, cilíndricas, com base mui
menos espessa quando considerada em relação ao comprimento. (*Esta diferen
subespecífica é, ao lado do colorido, constante e decisiva na diferenciação das
subespécies*).

Espinhos dos prefêmures 8 a 12, geralmente 10 ou 11, muitas vêzes em posição
ordenada, como em *v. viridicornis*. O número de espinhos na parte terminal de
prefêmures não pode ser, também nesta subespécie, aproveitado como carac
teristico contrariamente do que afirma Attems a respeito de *v. viridicornis*. A
contagem de espinhos, realizada em 13 exemplares, revelou os seguintes *número
médios*:

	0 espinhos	1 espinho	2 espinhos	3 espinhos
1.º par de pernas	26 vêzes			
2.º " " "	1 vez	14 vêzes	11 vêzes	
3.º " " "		20 "	6 "	
4.º " " "	1 "	16 "	9 "	
5.º " " "		17 "	9 "	
6.º " " "		20 "	6 "	
7.º " " "	3 vêzes	19 "	4 "	
8.º " " "		24 "	2 "	
9.º " " "	5 "	12 "	9 "	
10.º " " "	4 "	18 "	4 "	
11.º " " "	1 vez	19 "	6 "	
12.º " " "	2 vêzes	17 "	7 "	
13.º " " "	1 vez	17 "	8 "	

	0 espinhos	1 espinho	2 espinhos	3 espinhos
14.° " " "	1 "	13 "	12 "	
15.° " " "	2 vêzes	9 "	15 "	
16.° " " "	1 vez	14 "	11 "	
17.° " " "		20 "	6 "	
18.° " " "		8 "	18 "	
19.° " " "		3 "	21 "	1 vez (*)
20.° " " "			22 "	4 vêzes (**)

A mesma variante no número dêstes mesmos espinhos também se encontra em *v. viridicornis* o que vem provar de sobra o nenhum valor subespecífico e mesmo específico dêste característico.

Contudo, a tabela acima nos permite as seguintes deduções: a) No 1.° par de pernas nunca existem espinhos prefemurais apicais; b) Do 2.° até ao 16.° par de pernas pode ocorrer a ausência de espinhos, ainda que apenas em raros casos ou numa perna só; c) 17.° ao 20.° par nunca desprovidos de espinhos, mas sempre, pelo menos, com 1 espinho; d) 20.° par de pernas sempre com 2 ou 3 espinhos.

Diferenciação morfológica entre *v. viridicornis* e *v. nigra*

	v. viridicornis	*v. nigra*
Comprimento	até 176 mm.	até 103,5 mm apenas
Colorido	nunca com faixa preta anterior nos tergitos	sempre com faixa preta anterior, nunca com faixa escura posterior
Apófise coxopleural e espinho do canto ...	sempre longos, cilindricos	sempre curtos, cônicos com base larga e terminando em ponta.

Nota: Como a coleção quilopólica do Instituto Butantan teve que ser mudada diversas vêzes de local e recipientes, com conseqüênte reclassificação e numeração nova do material, os tipos e paratipos de *v. nigra* receberam a seguinte numeração definitiva:

Tipo: macho, No. 435; *local-tipo*: Terrenos, Matto Grosso.

(*) 1 vez 7 espinhos de formação anómala, como se pode ver no exemplar No. 436. O exemplar No. 421 demonstra que os 3 espinhos são anómalos.

(**) na área interna do prefêmur do 20.° par de pernas existe um espinho 22 vêzes e não existe espinho 4 vêzes.

Paratipos: 12 exemplares, sendo 4 machos e 8 fêmeas, sob os Nos. 184, 21 217, 226, 376, 421, 429, 432, 436, 201 e 224, procedentes, na maioria, igualme de Terrenos e alguns de Três Pontes, Paraná.

Scolopendra viridicornis spinipriva, subsp. n.

Comprimento: adultos até 62-82 mm (sem antenas e patas).

Colorido: 1.°, 2.° e 20.° segmentos avermelhados; o resto dos tergitos co color, marrom, com bordas posteriores esverdeadas. Esternitos, antenas e pern amarelos; o 1.° e 2.° tarsos dos 3 ou 4 últimos pares de pernas esverdeados.

Terceiro artículo dos segundos maxilares *sem a apófise ventral* na base d garra terminal, tão típica em *v. viridicornis* e *v. nigra* (Fig. 11), ou apenas c uma protuberância muito rudimentar, não em fórma de apófise.

Antenas com 16 artículos moniliormes ou num lado 16 e no outro 17. Apen 2 artículos basais inteiramente sem pêlos; o terceiro artículo ostenta pêlos n último terço distal, interno.

Coxosternum forcipular com 4 dentes de cada lado, de igual tamanho, esta os 3 internos reunidos mais ou menos num bloco dentário só. Abaixo do dente interno existe uma cerda a mais do que em *v. viridicornis*, cerda e nascida dum tubérculo, mas não cavidade, como em *v. viridicornis*. Sulc basais das placas dentárias formando ângulo obtuso. A continuação dos mesm sulcos muito curta, isto é, não atingindo o sulco horizontal. Sulco longitudin mediano presente e atingindo o sulco horizontal.

Placa cefálica com poucos poros e com 2 sulcos longitudinais muito leve divergentes na frente e atrás desfazendo-se numa rêde de finos sulcos horizonta

Primeiro tergito com fossa curva, inteiramente à vista ou parcialmente cobe pela borda posterior da placa cefálica. Com 2 sulcos longitudinais muito leve quase invisíveis, geralmente só bifurcados na frente ou então existe apenas u sulco bifurcado, tendo o outro uma formação incompleta. Em frente os sulc não atravessam a fossa curva nem se unem por meio de um sulco transversal. até ao 20.° tergito com 2 sulcos longitudinais, muito leves; no 2.° presente ape como 2 traços curtos, na borda posterior; 3.° tergito com os 2 sulcos simples, is é, não bifurcados na frente ou com uma bifurcação num ramo só e apenas mu pequena, pelo menos 3 vêzes menor do que em *v. viridicornis*. Do 4.° ao 2 tergito os 2 sulcos longitudinais são simples, indo de margem à margem. 2 tergito com quilha mediana muito leve, sem fossa, elevações ou tubérculos latera Carenas laterais do 5.° ou 7.° até ao 21.° tergitos.

Esternitos 2-20 com 2 sulcos longitudinais completos, melhor visíveis do q os dos tergitos. Último esternito com bordas laterais convergentes atrás; ma

longo que largo, com depressão mediana e com borda posterior reta nos machos e ligeiramente curva nas fêmeas. Campo poroso e apófise coxopleural como em *v. viridicornis*. O último, longo, cilíndrico, com 3 espinhos, sendo 2 colocados na ponta e 1 um pouco mais adiante.

Espinho do canto ("Eckdorn") do último prefêmur, longo, cilíndrico, com 3-5 espinhos robustos, recurvos. Espinhos no prefêmur de posição irregular e em número de 13 a 16, mais numerosos, portanto, do que em *v. viridicornis*. 20.º prefêmur com 2 espinhos na ponta e com 1 no meio; 10.º com 1 espinho só ou, raras vêzes, com 2 numa perna e 1 na outra; 18.º sem espinho algum ou apenas com 1 em cada perna ou numa perna com 1 e na outra sem espinho; 17.º com nenhum espinho ou ainda com 1 numa só perna: do 16.º até ao 1.º par de pernas não mais existe espinho algum na ponta dos prefêmures. 1.º par de pernas com 1 esporão no prefêmur, no fêmur e na tíbia e com 2 no 1.º tarso; 2.º até ao 20.º par apenas com 1 esporão tarsal, longo e robusto; 21.º par sem esporão tarsal. Tôdas as pernas com garra terminal e com 2 esporões na base da garra.

Tipo: No. 228 da coleção quilopódica do Butantan; fêmea.

Local-tipo: Arredores de Sto. André, perto da Capital de S. Paulo.

Paratipos: Alguns machos e fêmeas adultos, No. 273 da mesma coleção, capturados também nos arredores da Capital de São Paulo.

CARACTERÍSTICOS DIFERENCIAIS

Scolopendra viridicornis spinipriva, subsp. n. se distingue de S. v. viridicornis Newp. e S. v. nigra Buecherl:

a) pelo tamanho menor dos adultos;

b) pela ausência da apófise no artículo terminal do 2.º maxilar;

c) pela ausência de espinhos na parte superior terminal dos prefêmures 1-16, fator êste absolutamente seguro, pois êstes espinhos não faltam nem em adolescentes das duas outras subespécies (Nomen-*spinipriva* — privada de espinhos).

Scolopendra subspinipes Leach, 1815

A *Scolopendra subspinipes* é, segundo Attems, encontrada em todos os países tropicais e subtropicais, excetuada a região mediterrânea.

É atualmente subdividida em 5 subespécies, das quais três — a *S. s. mutilans*, a *S. s. japonica* e a *S. s. multidens* são encontradas exclusivamente no Japão, na China e em Java. *S. s. dehaani* Brandt é privativa da China, das

Malaias, das Índias. Portanto, apenas a *S. s. subspinipes* Leach, ... ocorre indistintamente nos paises de clima tropical e subtropical.

Também no Brasil temos exemplares, pertencentes ao grupo *subspini*... embora nenhum dos AA. se tenha referido esplicitamente à subespécie bra... leira. Como no primeiro tempo nós não tenhamos tido em mãos mais do ... um ou outro exemplar, sempre temos, em nossos trabalhos, assinalada esta ... espécie como sendo *S. s. subspinipes*. Agora, entretanto, dispondo já ... uma série relativamente grande, o estudo sistemático comparativo dêstes exe... plares nos parecia interessante, sendo que agora descrevemos os exemplares ... Brasil como uma nova subespécie:

Scolopendra subspinipes fulgurans, subsp. n.

Comprimento: (dos adultos, sem antenas e últimas patas) 112-146 mm:

último	prefêmur —	7 mm	de	compr.,	1,8 mm	de	largura
	fêmur	7 mm	"	"	1,5 mm	"	"
	tibia	6 mm	"	"	1,2 mm	"	"
	I tarso	4 mm	"	"	0,8 mm	"	"
	II tarso....	1,5 mm	"	"	0,6 mm	"	"

Colorido: Primeiro segmento, tergitos e último segmento, inclusive ... últimas pernas, amarelo marrom; esternitos, pernas e antenas, amarelo cla... Todo o corpo, principalmente os tergitos e esternitos apresentam um *brilho* ... (vide nomen), que faz com que se distinga esta subespécie nova facilmente d... outras espécies grandes de escolopendras brasileiras, principalmente as do gru... *viridicornis*.

Antenas: com 18 artículos (raras vêzes 19), sendo os 6 basais comple... mente desprovidos de pêlos, enquanto que os restantes artículos apresentam p... uniformes, loiros, densos, curtos.

Placa cefálica sem sulcos ou depressões, mas apenas com poros espars...

Coxosternum forcipular com leve depressão oblonga no meio da pla... Placas dentárias (Fig. 12) muito pequenas, rudimentares, não atingindo ma... do que 0,9 mm de largo e 0,8 mm de comprido, parecendo atrofiadas quan... comparadas com o desenvolvimento das de *viridicornis*. Entre as 2 placas med... um espaço, isto é, são bastante separadas entre si, como também do lado inter... do prefêmur. Dentes das placas dentárias extremamente pequenos e os 4 ... ternos soldados na base, sendo independentes apenas suas pontas terminais. ... 5.º dentículo é independente em via de regra. Raras vêzes também êste den... aliás sempre um pouco maior de que os outros, é mais extenso em largura, p...

recendo, então, constar de 3 denticulos soldados. Sulcos basais das placas dentárias em linha horizontal, formando 2 pequenas curvas (Fig. 12). Apófise prefemural quase inteiramente ausente. Em lugar dela 4 denticulos muito pequenos, dos quais os 3 anteriores reunidos num bloco só. Êstes denticulos são ainda menores do que os das placas dentárias.

Cerda das placas dentárias pequeníssima, nascida numa pequena cavidade (Fig. 12).

Esternitos 2-20 com 2 sulcos longitudinais, que percorrem a placa inteira somente nos esternitos 6-19; nos anteriores só existem na frente e no 20º mal atingem a metade da placa. Último esternito bem mais longo que largo, com bordas laterais convergentes e borda posterior fracamente bilobada nos machos, quase reta nas fêmeas; com depressão pouco profunda no meio.

Tergitos 3-20 com 3 sulcos longitudinais, muito leves, quase invisiveis no 20.º. Atrás sempre mais reforçados. Carenas laterais do 5.º até ao 21.º (às vêzes somente do 6.º ou 7.º). Último tergito sem sulcos nem depressões.

Apófise das coxopleuras com 2 espinhos pequenos em cada (raras vêzes 3). Último prefêmur com 5 espinhos, de posição simétrica, isto é, 1 *súpero-interno mediano*, no mesmo nivel do "Eckdorn" e, mais ou menos, equidistante do começo e do fim do prefêmur; 2 *internos*, dos quais o anterior é menor e de posição já mais ventral, e o posterior, maior, do mesmo tamanho do súpero-interno; 2 *ventrais*, dispostos numa linha reta, sendo o posterior do tamanho do interno posterior (quando há menos espinhos, trata-se de anomalia). Apófise do canto de prefêmur ("Eckdorn") com 2-3 espiculas terminais. 1.º par de pernas sem esporões no prefêmur, fêmur e na tibia e apenas com 1 esporão no primeiro tarso. Tôdas as pernas com subungulas nas garras.

Scolopendra subspinipes fulgurans, subsp. n. se distingue de *Scol. s. subspinipes* Leach: 1.º pelo colorido — completamente uniforme em subsp. **subspinipes** ou, quando variado, a cabeça e o 1.º tergito são muito mais claros do que o resto do corpo, côr de oliva. Em *s. fulgurans* existe o amarelo claro nas pernas, esternitos e antenas; amarelo marrom nos tergitos e marrom tijólo no primeiro e último segmento; 2.º pela morfologia do coxosternum forcipular que, na subespécie nova, apresenta uma cavidade no meio da área, placas dentárias muito pequenas; ausência de apófise prefemural; denticulos prefemurais e das placas dentárias muito pequenas, mas sempre em número constante, enquanto que em *subspinipes subspinipes* não existe a cavidade; as placas dentárias têm proporções normais; a apófise prefemural está desenvolvida e o número de dentes varia muito (de 4 a 9); 3.º os sulcos

paramedianos dos tergitos começam sempre no 3.º e vão até ao 20.º tergito na subespécie nova, enquanto que em *subspinipes subspinipes* começam óra no 3.º, óra no 6.º ou 8.º tergito. As carenas laterais sempre começam no 5.º tergito em *S. s. fulgurans*, subsp. n., enquanto que em *S. s. subspinipes* há uma variação muito ampla, com início de carenas às vêzes somente depois do 10.º tergito, embora a regra seja desde o 5.º ou 7.º; 4.º vigésimo esternito com 2 sulcos longitudinais na subespécie nova, ausentes em *S. s. subspinipes*; 5.º em *S. s. subspinipes* o número de espinhos no último prefêmur varia de 3 a 8 os espinhos na apófise do canto de 1 a 5, enquanto que em *S. s. fulgurans*, subsp. n. existem sempre apenas 5 espinhos no prefêmur e 3 no canto.

Tipo: Macho adulto, de 132 mm, da Coleção do Instituto Butantan, No 18..

Local tipo: Rubião Junior, Sorocabana, Estado de São Paulo.

Paratipos: 2 machos e 3 fêmeas, de Sta. Catarina, Paraná e São Paulo.

Scolopendra pomacea minuscula, subsp. n.

Medidas: Antenas 7 mm de comprimento; Placa cefálica 2.30 mm de comprimento e 2,50 mm de largura.

Últimas pernas: prefêmur 2,30 mm de compr.; fêmur 1,50 mm de compr.; tíbia 1,20 mm de compr.; I tarso 1,00 mm de compr.; II tarso 0,6 mm de compr.; garra terminal 0,50 mm de compr., muito curva.

Comprimento do tronco (sem antenas e últimas patas): 33,50 mm.

Último esternito: 1,00 mm de largura na frente; 0,50 mm de largura atrás (como diâmetro na curva) e 1,10 mm de compr. total. Último tergito 1,60 mm de largura na frente e 1,70 de largura atrás e 1,30 mm de comprimento.

Colorido: Antenas, pernas e esternitos amarelo doirados; placa cefálica e primeiros dois tergitos amarelo escuros, nítidamente destacados dos outros tergitos, cujos bordos anterior e posterior apresentam uma faixa verde escura.

Antenas sempre com 18 artículos, sendo os primeiros 10 mais largos do que longos e invertendo-se esta relação de medida nos artículos terminais. Os artículos basais inteiramente sem pêlos, no 4.º artículo e ainda mais no 5.º a área pilosa, no lado ventral interno, já presente. Lado dorsal externo ainda sem pêlos no 4.º e parcialmente no quinto (Fig. 13).

Placas dentárias (Fig. 13) mais ou menos tão largas quanto longas, mais largas na base do que na sua parte terminal, com 4 dentes pequenos, de igual tamanho e completamente isolados em cada placa e com 1 pequena cerda logo atrás do 2.º dente interno. Sulcos basais formando um ângulo de 160 graus, mas não continuados além das placas dentárias (Fig. 13). Na área mediana existe um sulco longitudinal anterior, bem nítido. Sem cavidade na área mediana, atrás do sulco longitudinal.

Escovas de cerdas do 2.º maxilar ("Putzbuersrte") muito robusta e atingindo a parte terminal da garra. Esta com 2 pequenas garras na base. Porção terminal do 3.º artículo com cerdas longas, irregularmente distribuidas; parte apical apenas com cerdas curtas. Lado ventral, na base da garra terminal sem a apófise quitinosa, tão típica em *S. viridicornis*. 2.º artículo do mesmo maxilar, na parte terminal, com uma cerda robusta (Fig. 13).

Esternitos 2-20 com 2 sulcos longitudinais paralelos, muito leves em frente e atrás, de maneira que parecem existir apenas na parte mediana de cada placa. Último esternito com borda posterior arqueada e com depressão longitudinal mediana, quase imperceptível.

Placa cefálica cobrindo o 1.º tergito. Sem sulcos ou depressões; apenas com poros muito esparsos. 1.º tergito com fossa semi-circular bem nítida; sem sulcos. 2.º e 3.º tergitos sem sulcos longitudinais. 4.º e às vêzes já o 3.º tergitos com 2 sulcos posteriores muito curtos. Do 5.º ao 20.º tergito sulcos paramedianos completos. Último tergito com bordas posteriores quase paralelas (vide medidas) e com borda posterior arqueada, fracamente bilobada. No meio dêste tergito existe uma elevação lisa, semelhante à de *S. viridicornis nigra* Buecherl, mas sem a quilha.

Coxopleuras (Fig. 14) com campo poroso mal atingindo a metade das coxopleuras. Poros nítidos, mas muito menos numerosos do que em S. *viridicornis*, por exemplo. Apófise coxopleural pouco saliente, cônica, isto é, com base muito mais larga do que a parte terminal, com 3 pequenos espinhos na parte terminal. *Sem espinho na margem lateral.* Últimas pernas no prefêmur com 6-7 espinhos pequenos, dispostos em 3 filas longitudinais; no lado interno com 2-3 e no lado súpero interno com 5 espinhos. "Eckdorn" com 4 - 5 espinhos. Lado superior, terminal dos prefêmures das pernas 20 com 2 espinhos muito pequenos. Prefêmures 1 a 19 sem espinhos no lado terminal dorsal. 1º par de pernas com um esporão no lado ventral, apical do prefêmur, do fêmur e da tibia e com 2 esporões no 1º tarso. Pernas 2 - 20 com 1 esporão tarsal.

Scolopendra pomacea minuscula, subsp. n. se distingue de *S. pomacea pomacea* Koch, 1845: 1º pelo habitat — *pomacea pomacea* é do México; *pomacea minuscula* é de Goyaz; 2º pelo tamanho — a subespécie de Koch mede 60 mm, enquanto que os adultos da presente subespécie nova não excedem 34 mm, podendo constatar-se pelo desenvolvimento completo dos órgãos genitais internos que se trata realmente de adultos; 3º pelo colorido: *pomacea pomacea* é verde oliva, com pernas amarelas, geralmente com tarsos esverdeados; *pomacea minuscula*, subsp. n. apresenta faixas verde escuras nas bordas dos tergitos, sendo as pernas de um amarelo doirado; 4º Coxosternum forcipular sem sulco longitudinal mediano em *pomacea*, com sulco mediano na subespécie nova; 5º sulcos paramedianos

nos tergitos 2 - 20 em *pomacea pomacea*; completos somente nos tergitos 5 - 20 na subespécie nova (raras vêzes 2 sulcos posteriores curtos nas placas 4 e 3). Carenas laterais em *pomacea pomacea* presentes somente desde o 16º ou 17º tergito, presentes já no 12º na subespécie nova; 6º Coxopleuras na margem posterior com 1 - 2 espinhos em *pomacea pomacea*; sem êstes espinhos em *pomacea minuscula*.

Tipo: fêmea No. 461 da coleção quilopódica do Instituto Butantan

Local-tipo: Veadeiros, Estado de Goyaz

Paratipos: Três exemplares, também de Goyaz.

Gênus *Otostigmus* Porat, 1876

Otostigmus dentifusus, sp. n.

Medidas: Comprimento (Sem antenas e últimas patas) 42mm;

Comprimento da placa cefálica .... 2,7 mm; 3,6 mm larg.
" do primeiro tergito .... 2,0 mm; 4,0 mm "
" do segundo " .... 0,7 mm; 3,8 mm "
" do terceiro " .... 1,9 mm; 3,7 mm "
" do quarto " .... 1,1 mm; 3,5 mm "
" do 21º tergito (no meio) 2,0 mm, no lado carenado 1,5 mm; largura 2,1 mm.

Comprimento da placa dentária 0,4 mm; 0,4 mm larg.

Última perna: prefêmur 2,2 mm; fêmur 1,9; tíbia 1,8 mm; I tarso 1,7 mm; II tarso 1,2 mm.

Colorido: Fêmures, tíbias e primeiros tarsos verdes. Nos últimos três pares de pernas o verde cede suavemente lugar ao roxo. Prefêmures, última porção dos segundos tarsos, parte apical dos fêmures anteriores, esternitos e antenas amarelo escuros. Pêlos das antenas amarelo doirados. Tergitos côr de castanha. Primeiro tergito e coxosternum vermelho tijolo.

Antenas: com 17 artículos, dos quais os 2 primeiros não apresentam pêlo algum, enquanto que o terceiro já apresenta pêlos no terço distal. *Placas dentárias* do coxosternum (Fig. 15) com 4 dentes em cada placa, completamente soldados num bloco só (vide nomen). Atrás uma pequena cerda, nascida em depressão redonda. Sulcos basais das placas dentárias formando um ângulo obtuso, com um curto prolongamento sulcal em ambos os lados. No meio um curto sulto sulco mediano longitudinal (Fig. 15). Placas dentárias tão largas quanto longas (conf. medidas).

Placa cefálica lisa, com poucos poros, sem sulcos ou depressão; um pouco mais longa do que larga. Sulcos paramedianos dos tergitos presentes desde o 6º até ao 20º. Nos últimos três tergitos os sulcos são muito leves e mal visíveis. Carenas laterais somente no 21º tergito: do 3º ou 5º ao 19º tergito existem ligeiros bordos laterais, mas que não abrangem todo o percurso dos lados, como as pseudocarenas. Tergitos glabros, sem quilhas ou tubérculos ou rugosidades.

Esternitos (Fig. 16) glabros, com uma grande depressão muito pouco profunda e nesta depressão 4 cavidades pequenas, sendo 2 medianas e 2 laterais anteriores. A media anterior é a maior, enquanto que as 2 laterais nem sempre são bem nítidas em todos os esternitos. Sem sulcos longitudinais. 21º esternito (Fig. 16) com borda posterior truncada e bordas laterais convergentes. Com depressão longitudinal mediana.

Pernas: Primeira e segunda ou terceira com 2 esporões tarsais; quarta até a 18 ou 19 com 1 esporão tarsal: 19 ou 20 e 21 sem esporão. Prefêmur, fêmur e tibia do primeiro par de pernas sem esporão.

Não existem caractéres sexuais externos diferenciais entre machos e fêmeas.

Tipo: Macho adulto, da coleção quilopódica do Instituto Butantan, No. 477.

Local-tipo: Arredores de Itanhaem, Estado de São Paulo.

Paratipos: 7 exemplares, machos e fêmeas, do mesmo local.

Otostigmus limbatus Meinert, 1886

Durante o ano de 1945 o Instituto Butantan recebeu perto de 80 exemplares, entre machos e fêmeas, pertencentes a esta espécie e oriundos principalmente dos Estados de Sul do Brasil, a saber, de São Paulo, do Paraná, de Sta. Catharina e do Rio Grande do Sul. Como já temos constatado no nosso trabalho "Os Quilópodos do Brasil", em 1939, à página 271, os exemplares recebidos pertencem tanto a *Otostigmus limbatus limbatus* Mein., 1886 como a *Otostigmus limbatus diminutus* Buecherl, 1939 (*non limbatus*).

Como o maior número de animais permite uma melhor caracterização de *O. l. diminutus* e sua distinção de *O. l. limbatus*, damos aqui uma recapitulação mais minuciosa do que escrevemos em 1939.

Otostigmus limbatus diminutus

Medidas: (média entre 11 exemplares adultos) — 47 mm de comprimento sem antenas e últimas pernas; antenas: 11 mm de comprimento: comprimento da placa cefálica 3 mm; largura 2,70 mm. Comprimento do 21º tergito 1,80 mm no meio e 1,25 mm nos lados: largura do mesmo 2 mm. Comprimento do 21º esternito 1mm; largura anterior 1,15 mm; posterior (em diâmetro da curva)

0,70 mm. Última perna: comprimento do prefêmur 2mm; do fêmur 2,14 mm; tíbia 1,80 mm; I tarso 1,30 mm; II tarso 1 mm.

Comprimento de *O. limbatus limbatus* Mein., 48 mm. Todas as outras medidas não são mencionadas pelo A.

Colorido: de *O. limbatus limbatus*: azul esverdeado ou acastanhado. De *O. l. diminutus* — os 5 artículos basais das antenas e geralmente também os artículos terminais das mesmas; pernas e esternitos amarelo-doirados. Placa cefálica, primeiro segmento do tronco e último segmento inclusive as últimas pernas, amarelo-avermelhado. Tergitos de um amarelo-cinzento, com bordas laterais pretas e 2 estrias enegrecidas ao longo dos dois sulcos episcutais (o colorido preto é típico em *O. l. diminutus* vivos, podendo êstes ser reconhecidos já à primeira vista por êste desenho; com permanência em alcool, porém, o colorido preto empalidece aos poucos).

Antenas com 17 artículos em ambas as subespécies. Em *O. l. limbatus* 3 artículos basais completamente sem pêlos; em *O. l. diminutus* apenas 2 artículos basais inteiramente sem pêlos; o 3º artículo já com pêlos numa pequena área pilosa abrangendo já a metade distal interna. Do 5º artículo em diante os pêlos cobrem o artículo todo. 4 dentes em cada placa dentária em *O. l. limbatus* e em *l. diminutus*. Mas na última subespécie os dentes são completamente soldados na base embora suas pontas estejam independentes. Placas dentárias mais longas que largas, com cavidade sub-redonda e 1 cerda. Sulcos basais de *O. l. diminutus* formando um arco, aberto atrás e com sulco mediano, longitudinal, anterior (ausente em *O. l. limbatus*). *O. l. limbatus* com sulcos episcutais desde o 5º tergito; com carenas laterais somente no 21º e sem quílis mediana. *O. l. diminutus* já com 2 curtos sulcos anteriores nos tergitos 2, 3 e 4; nos tergitos 3 e 4, além disso também com 2 sulcos curtos posteriores. Do 5º ao 20º tergito com sulcos completos. 21º tergito com curta quilha mediana anterior terminando numa depressão. Desde o 5º tergito há, ainda, entre os 2 sulcos longitudinais, uma ligeira elevação longitudinal a imitar uma quílha. Carenas laterais só no 21º tergito. Os 5 tergitos precedentes com elevações das bordas laterais em fórma de pseudo-carenas.

O. l. limbatus com 2 sulcos longitudinais completos nos esternitos 2 a 20 e com 2 cavidades medianas. Em *O. l. diminutus* existem apenas sulcos longitudinais anteriores, curtos, nos esternitos 1 a 4. Do 5º ao 20º esternito os sulcos são completos, mas sempre mais nítidos na parte anterior. Desde o 5º até ao 20º esternito as 2 cavidades medianas são visíveis. Último esternito um pouco mais largo que longo, com borda posterior quase reta, apenas arredondada nos cantos.

O. l. limbatus com 1 esporão tarsal quase invisível no 1º par de pernas; as outras pernas geralmente sem esporão tarsal; raras vêzes com 1 esporão tarsal muito pequeno. *O. l. diminutus* com 1 esporão no fêmur e na tíbia do 1º par de pernas e com ou 1 ou 2 pequenos esporões tarsais nos primeiros três pares de pernas. Tôdas as outras patas sem esporão tarsal, mas com 2 pequenas garras na base da garra terminal.

Tipo:Fêmea adulta, apreendida na Capital de São Paulo e depositada na coleção quilopódica do Instituto Butantan, sob o No. 498.

Paratipos: Uma série de exemplares, machos e fêmeas.

RESUMO

O presente trabalho representa as novidades sistemáticas encontradas no material quilopódico enviado ao Instituto Butantan pelos fornecedores de ofídios e outros animais venenosos, durante os anos de 1943 a 1945.

São descritas como novas as seguintes fórmas: *Scolopendra morsitans amazonica*, subsp. n.; *Scolopendra viridicornis spinipriva*, subsp. n.: *Scolopendra subspinipes fulgarans*, subsp. n.; *Scolopendra pomacea minuscula*, subsp. n. e *Otostigmus dentifusus*, sp. n.

Foram estabelecidos novos caractéres morfológicos e invalidados antigos para a distinção entre *S. viridiconis* e *S. v. nigra* e entre *Otostigmus limbatus limbatus* Mein. e *O. l. diminutus* Buecherl. Igualmente fica demonstrado contra Attems, Chamberlin e outros que a presença de espinhos na borda terminal dos prefêmures das pernas e o número dêstes espinhos *nenhum valor sistematico tem para distinguir as subespécies* ou mesmo as espécies afins, em *Scolopendra viridicornis*.

ABSTRACT

The Chilopoda material, collected during the three last years by the Instituto Butantan, São Paulo, Brazil, is classified and the following new species and subspecies are described: *Scolopendra morsitans amazonica*, n. subsp.; *Scolopondra viridicornis spinipriva*, n. subsp.; *Scolopendra subspinipes fulgurans*, n. subsp.; *Scolopendra pomacea minuscula*, n. subsp. and *Otostigmus dentifusus*, *n. sp.*

News morphologic characters for the distinction of *S. viridicornis viridicornis* Newp. and *S. viridicornis nigra* Buecherl are presented, as for *Otostigmus limbatus limbatus* Mein. and *O. limbatus diminutus* Buecherl. The worthlessness of specific and subspecific distinctions based on the presence and on the number of spines in the prefemora of *Scolopendra viridicornis* is also proved.

Fig 1
Fig. 2
Fig 3
Fig 4
Fig 5
Fig 6
Fig. 7
Fig. 8
Fig. 9

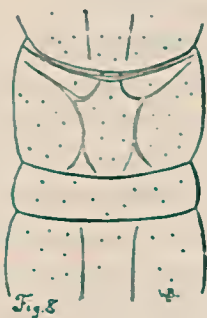
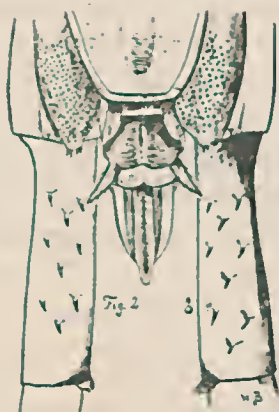
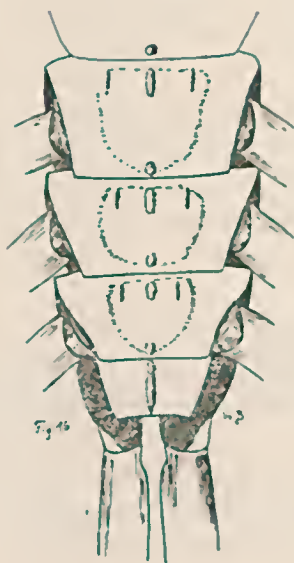
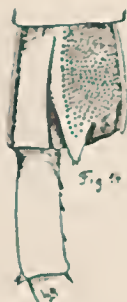
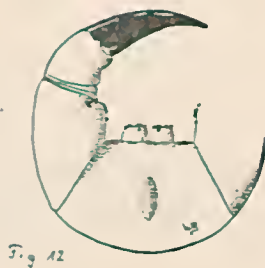
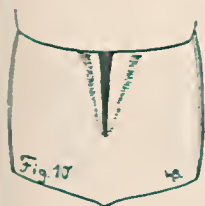
Fig. 10

Fig. 11

Fig. 12

Fig. 15

Fig. 16

Mem. Inst. Butantan,
19:159-180, 1946.

SPOTTED FEVER IN MEXICO

Immunological relationship between the virus of the rickettsiosis observed in Sonora and Sinaloa, Mexico, and other Spotted Fever viruses

BY A. VALLEJO-FREIRE

(From the Virus Laboratory, Instituto Butantan, São Paulo, Brazil)

In 1929 an infection identical with Rocky Mountain Spotted Fever was recorded in Brazil, first in the State of São Paulo (1, 2), then in Minas Gerais (3), and lately in the State of Rio de Janeiro (4). Cross immunity tests, made by several investigators (5-9), proved the identity of both infections, and gave evidence that Rocky Mountain Spotted Fever, transmitted to man chiefly by *Ixodidae* of the genus *Dermacentor* and possibly by *Amblyomma americanum* (20), is immunologically identical with São Paulo and Minas Gerais Spotted Fever, transmitted by ticks of the genus *Amblyomma*.

More recently (10,11), under the name of "Fiebre petequial de Tobia", an infection has been described in Colombia the clinical characteristics of which resemble those of the Rocky Mountain Spotted Fever group. *Amblyomma cajennense*, found spontaneously infected was indicated as one of the *Ixodidae* responsible for the transmission of the disease (10). Preliminary protection tests against Rocky Mountain Spotted Fever, made with serum of "Fiebre petequial de Tobia" cases, showed that both infections are identical.

Hence, presently, Spotted Fever has been recorded and thoroughly studied in America in several regions of only three countries, namely in the United States, Brazil (São Paulo, Minas Gerais and Rio de Janeiro) and Colombia (Tobia).

In other paper (12) we studied several properties of a virus strain of a new rickettsiosis, isolated from a suspected human case of Spotted Fever and clinically identified with several other cases lately recorded in the States of Sonora and Sinaloa (Mexico).

The strain studied by us showed, in laboratory animals, an experimental behaviour similar to that of the most virulent strains isolated from severe Spotted Fever cases, either in the United States, or in Brazil, with a possible

(Entregue para publicação em outubro de 1945).

greater tendency to scrotal reactions in guinea-pigs. These findings confir the preliminary papers of Bustamante and Varela (13, 14), who conclude tha owing to the clinical characteristics of the infection in man, the epidemiologic data, the mortality and clinical aspect of the infection in the guinea-pig, Sono and Sinaloa cases resemble Rocky Mountain Spotted Fever.

In the mentioned paper (12) we describe certain cultural characteris of the rickettsia and show that the *Ixodidae* of the genus *Amblyomma* (*Am blyomma striatum*) are able to infect themselves on guinea-pigs during th period of virus' circulation and transmit the disease by biting other animals.

All these experimental results would suggest that the exanthematic infec tion, known as "Fiebre pinta" or "Fiebre de Choix", recognized among th populations of rural zones of the States of Sonora and Sinaloa, is identic with Rocky Mountain Spotted Fever.

The study of the immunological identity of the virus recently isolated by Bustamante and Varela in Mexico is therefore of high importance, since might confirm the suspicion held by several investigators that the geograp distribution of the infection is much wider than pointed out until presen

In this paper we report the results of experiments made with the purpo of studying the immunological properties of this new Mexican rickettsiosis vir by means of cross immunity and neutralization tests against strains of Spo Fever virus isolated in certain regions of the State of São Paulo. We sha also report experiments on the protective value of vaccines prepared wi the viruses of São Paulo and Rocky Mountain Spotted Fever against th "Fiebre de Choix".

EXPERIMENTAL

Material and methods

A. *Virus strain*

1. *BV strain.* Received from Mexico, where it was isolated from a human cas "Fiebre pinta" by Bustamante and Varela and sent to us in a female of *Ornithodoros* fed on infected animal. Received in our laboratory on December 11th, 1944 and maintai by passages in guinea-pigs.

2. *S strain.* Isolated from B. S., who died from Spotted Fever in June, 1941. Araras, State of São Paulo. At the beginning of this study it counted 184 serial passa in guinea-pigs.

3. *L. strain.* Isolated from spontaneously infected *Amblyomma cajennense* nymph re moved from a hare in Araras, State of São Paulo, in September, 1942. Number of passa at the beginning of this study: 86.

4. *F strain.* Derived from a batch of adult *Amblyomma cajennense* specimens, found spontaneously infected and removed from a horse in Loreto, near the city of Araras, in August, 1942. 101 passages in guinea-pigs.

All the three virus strains isolated in São Paulo are highly virulent and proved antigenically identical in experiments carried out in our laboratory.

The number of passages in guinea-pigs of each of the viruses used in the tests will be marked in parenthesis immediately behind the letter of the strain.

B. *Virus blood*

Obtained by cardiac puncture from guinea-pigs experimentally inoculated with infectious material on the second or third day of thermic reaction. The blood was received in sodium citrate solution to prevent coagulation or shaken with glass beads immediately after bleeding. When larger amounts of inoculum were required, blood samples of several guinea-pigs were pooled and allowed to stand overnight in the ice-box, while the sterility tests were performed.

Occasionally, mixtures of two antigenically identical virus strains were made: these cases are especially indicated in the text.

C. *Immune-protective serum*

The animals, rabbits or guinea-pigs, which survived infection and were employed for production of immune serum containing protective antibodies, were bled through the heart a few days after the last day of temperature over 39.6°C. The blood was allowed to clot at room temperature for one hour and then placed in the ice-box (+ 4°C.) where it was left overnight. After separation, the serum was stored at 4°C.

The amounts of serum used in the neutralization tests were deliberately high, since we had only the intention to prove the immunological identity of the various strains, disregarding the quantitative estimation of homologous antibodies.

D. *Guinea-pigs*

All animals inoculated with BV virus strains were kept under observation in well isolated cages, far from any contact with animals infected with other Spotted Fever virus strains under study in the laboratory.

In the comparative tests for the antigenic properties of different virus strains we have employed guinea-pigs weighing from 350 to 370 gr. In groupe tests we have always tried to use animals from the same breeding. The animals were checked daily, and the rectal temperature taken once or twice a day. The curves show the temperatures taken between noon and 1:00 p.m. 39°C. was considered the maximum normal temperature limit for guinea-pigs. Temperatures exceeding this maximum limit are black printed in the curves.

I. CROSS IMMUNITY BETWEEN THE VIRUS OF THE NEW MEXICAN RICKETTSIOSIS AND THE SPOTTED FEVER VIRUS

a) *Protection against the Mexican virus shown by guinea-pigs recovering from Spotted Fever* — In early experiments on the therapeutic action of Penicillin (sodium salt), a large number of guinea-pigs were inoculated with 0.5 cc. of a mixture of São Paulo Spotted Fever virus-blood. From those

animals. 23 survived typical, but comparatively benign infection, including in this total number several animals used as controls for virus activity. In this test the action of penicillin was nihil, no influence being detected upon infection's course or mortality rate in relation to untreated controls.

We took advantage of the rare opportunity of having at our disposal such a large number of animals surviving an infection produced under uniform conditions, in order to test the protection against the homologous virus, as well as against the Mexican virus.

Twenty days after the infective inoculation, and 4 to 7 days after the temperature fall, the animals were bled from the heart and the sera (1.5 to 2 cc. from each guinea-pig) pooled and stored at +4°C.

The animals remained under observation for another 5 days after bleeding in order to exclude those dying from heart puncture.

The survived guinea-pigs were thereupon reinoculated intraperitoneally as follows:

12 with 0.5 cc. of BV virus-blood (Mexico)

11 with 0.5 cc. of F+S virus-blood (São Paulo, Brazil)

10 normal guinea-pigs served as controls of the virus activity

5 inoculated with 0.5 cc. of BV virus and

5 with 0.5 cc. of a virus-blood mixture prepared with the blood of guinea-pigs infected with F or S strains.

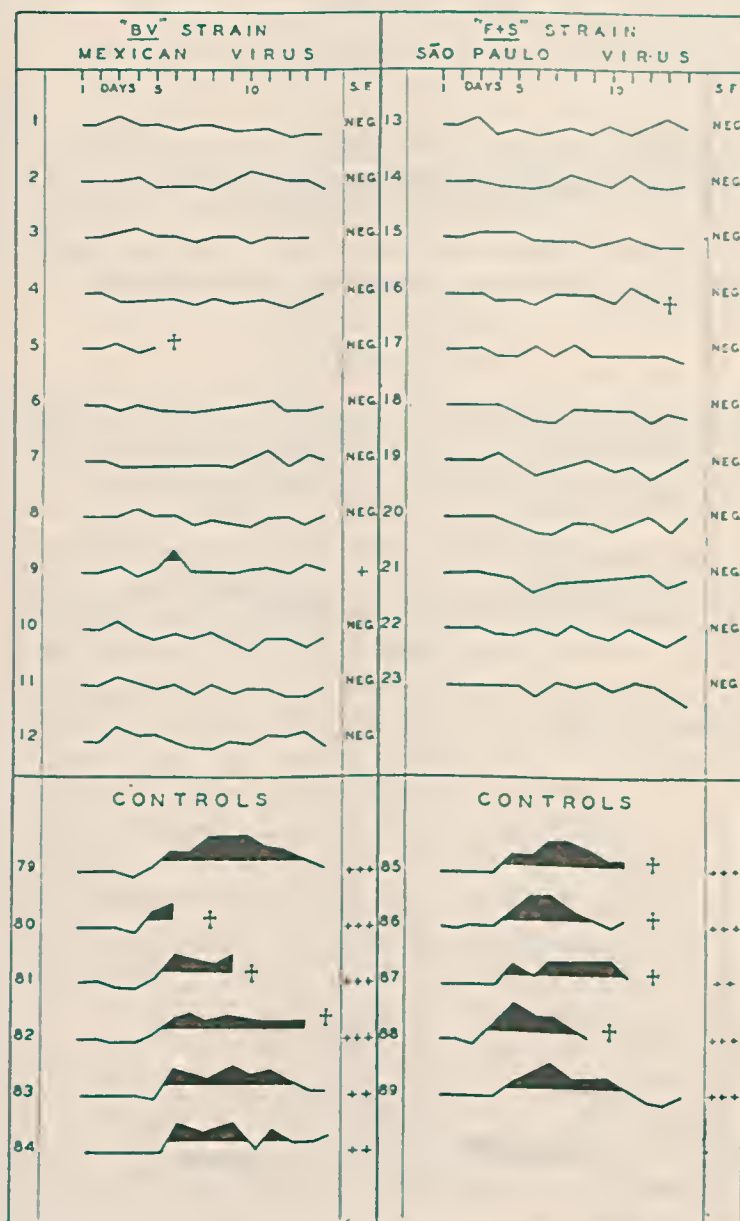
All inoculated animal remained under observation for a fortnight when the survivors were killed for examination of the internal lesions.

The behaviour of the controls was satisfactory, since all the animals reacted typically and showed at the necropsy lesions common to the most virulent Spotted Fever strains. The guinea-pigs inoculated either with homologous virus or with BV virus, displayed complete protection against infection and death. Animals No. 5 and No. 16 apparently did not die from Spotted Fever, since no post-mortem alterations were found to support this diagnosis: in one of them we found a small abcess in the rectum, probably caused by the introduction of the thermometer as the temperature was taken. In another survivor, guinea-pig No. 9, there was at necropsy a slightly large, congested spleen, but two hepatic abcesses were also detected.

All test animals, in contrast with the controls, failed to show any lesion suggestive of Spotted Fever. No conspicuous spleen enlargement was observed, although discrete congestion of the organ has been recorded in some cases and among the male animals not a single scrotal reaction was found.

The significance of these findings is especially pointed out, since such a complete protection is very seldom observed.

TABLE 1

Cross immunity. Comparative study of the behaviour of spotted fever survived guinea-pigs, reinoculated with homologous virus and BV strain of Mexican rickettsiosis virus

b) *Presence of protective antibodies against BV virus in sera of guinea-pigs recovering from São Paulo Spotted Fever* — In order to confirm the preceding results another test was set up with a mixture of sera collected from guinea-pigs used in the former experiment. Ten guinea-pigs were inoculated:

5 with 2 cc. of the mixture of guinea-pigs convalescent sera + 0.30 cc. of "F" virus-blood. and

5 with 2 cc. of the mixture of the same serum + 0.30 cc. of "BV" virus-blood.

The serum-virus mixture were kept for one hour at room temperature (18-20°C.) and then inoculated intraperitoneally in guinea-pigs. For each virus type three controls were included. which received the same amounts of normal guinea-pigs serum and virulent material. After 15 days of observation, the survived animals were killed and examined for internal lesions.

TABLE II

Guinea-pigs inoculated with mixture of guinea-pigs convalescent Spotted Fever sera and "BV" strain of Mexican rickettsiosis virus. Comparison with mixtures prepared with homologous virus

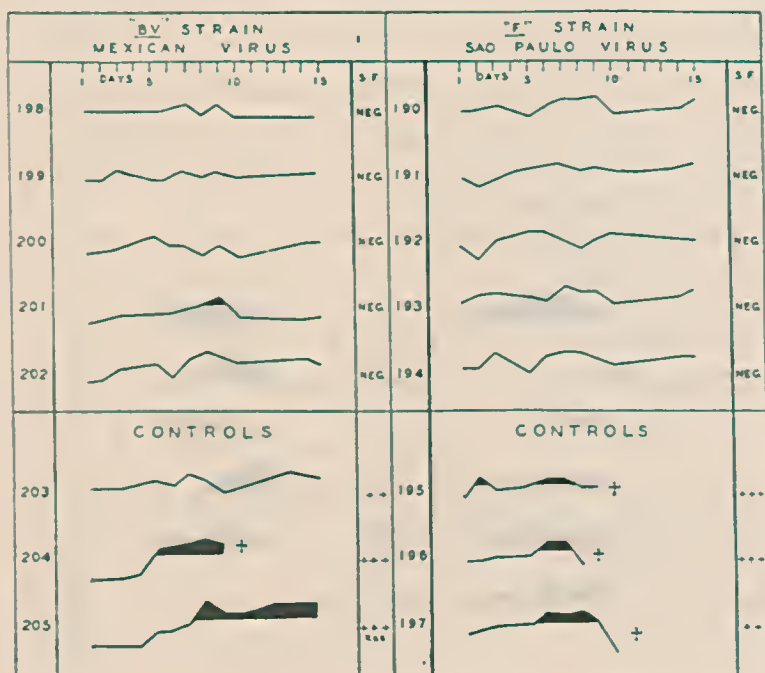



Table II gives the temperature curves of the guinea-pigs, as well as the intensity of the lesions of the internal organs. The results obtained show a satisfactory protection against the homologous virus, as well as against BV strains, although the controls have not exhibited a very intense thermic reaction, due, perhaps, to a spoiling effect of the room temperature upon the small dose of virulent material used.

Conclusion — Guinea-pigs recovering from infection with Brazilian Spotted Fever virus (São Paulo), show solid protection against Sonora and Sinaloa rickettsiosis.

Immune sera obtained from guinea-pigs after experimental infection with São Paulo Spotted Fever virus during the first week after temperature fall contain protective antibodies against both the homologous (F) and the Mexican (BV) viruses.

2. NEUTRALIZATION TESTS WITH RABBIT ANTI-RICKETTSIAL IMMUNE SERUM

a) *Neutralization test perfomed with BV virus and Spotted Fever convalescent rabbit serum* — The immune-serum mixture used in this test was pooled from 10 rabbits which survived infection caused inoculation of virulent blood of a guinea-pig infected with strain S. These rabbits had been employed in the production of Spotted Fever vaccine for the feeding of *Amblyomma cajennense* nymphs, already infected in the larval stage, also with virus S. The animals were bled 6 to 10 days after fall of temperature. Weil-Felix reaction of the sera mixture showed the following titers: *B. proteus* OX19 (1/320), OX2 (1/80) and OXK (1/160).

For the neutralization test, mixture of 2 cc. of immune serum and 0.30 cc. of virus-blood were used after incubation at room temperature (about 20°C.) for one hour. The controls received the same mixture containing normal rabbit serum instead of immune serum.

Five guinea-pigs were injected subcutaneously with mixture of inune anti-S serum and F virus (*101*), five others with immune anti-S serum and L virus and ten with immune anti-S serum and BV virus (*5*). Ten controls received a mixture of normal rabbit serum and virus: three, the F strain (*101*), two, the L virus and five, the BV virus-blood (*5*). Three of the latter received the material used in the first five guinea-pigs and two that of the five last ones.

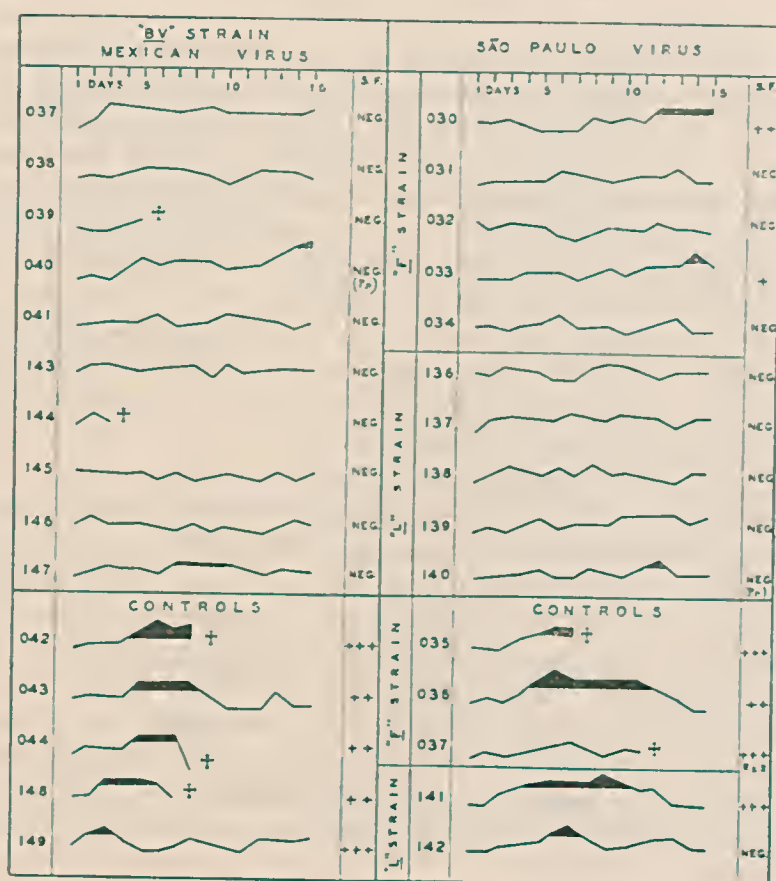
The animals were observed during 15 days (Table III).

The neutralization of the Mexican virus by the immune anti-S serum was complete in the eight animals which lived until the end of the observation. Guinea-pig No. 144 died during the period of incubation from a cause unrelated to the experiment, and guinea-pig No. 030 did not present any reaction nor typical Spotted Fever lesion.

The results of the protection gained by the immune anti-S serum against the F and L strains were also satisfactory. The neutralization was complete for the L strain; as to the F virus, only guinea-pig No. 030 suffered delayed thermic reaction, with temperature over 40°C., beginning on the 12th day of inoculation and lasting only until the 15th. Post-mortem, there were alterations of moderate intensity, with a more or less enlarged spleen.

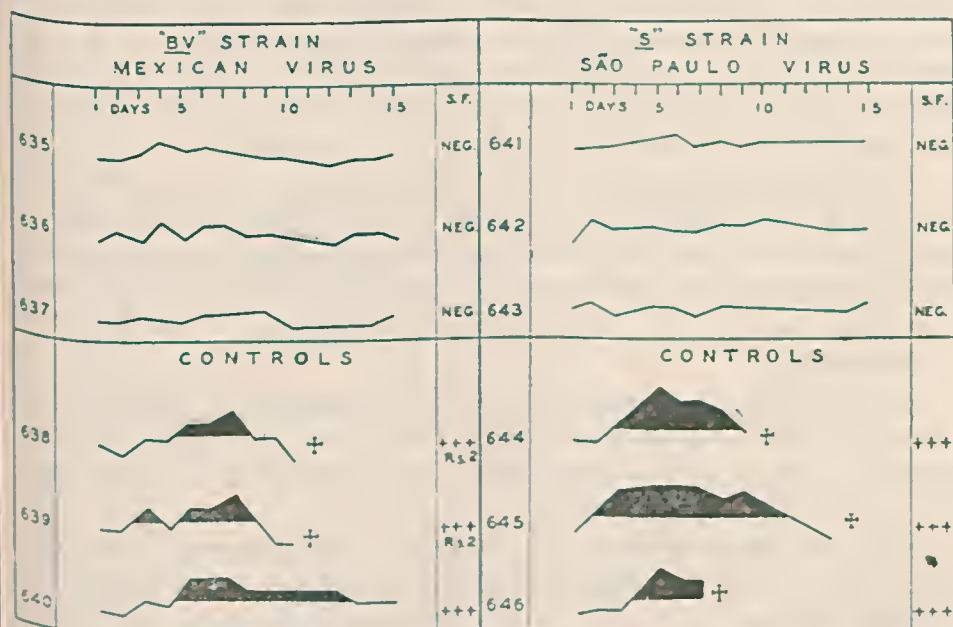
b) *Neutralization test with immune anti-BV serum S São Paulo rickettsiosis virus.* — The serum of rabbits infected with BV virus *(6)* and bled a few days after temperature fall was used for the protection test against strain S of São Paulo Spotted Fever virus. Since only three rabbits were available and only a small serum volume could be obtained, we were obliged to reduce the number of guinea-pigs in the test.

TABLE III

Neutralization test. Behaviour of guinea-pigs inoculated with mixture of anti-S São Paulo Spotted Fever convalescent rabbit serum and virus BV *(México)*, F and L *(São Paulo)*

Six male guinea-pigs were injected subcutaneously with 2.5 cc. of a mixture of 2 cc. rabbit serum and 0.5 cc. virus-blood, prepared at the moment of injection. The test animals received immune serum and the controls normal rabbit serum. Of the test guinea-pigs, three were injected with mixture of serum and homologous virus and the other three with serum and S virus-blood *(98)*.

The protection obtained by anti-BV serum (table IV) was complete against S virus *(98)*, as well as against the homologous virus. Notwithstanding the small number of animals included in the test, the results obtained are highly significant, because of the high virulence of the virus-blood strains used, as shown by the reactions, mortality and lesions in the control group. Of the three

TABLE IV

Neutralization test. Results of inoculations of guinea-pigs with mixture of anti-BV convalescent serum and S São Paulo spotted fever virus as compared with mixtures of homologous virus

Controls injected with BV virus and normal rabbit serum, two suffered scrotal reaction of moderate intensivity, whereas none of the three animals injected with immune serum presented edema of the scrotum skin or, at necropsy, inflammation of the vaginals or any other alteration of the type of those which occur in cases of scrotal reactions.

Conclusion — The results of the virus neutralization tests prove that the immune anti-S serum, obtained from rabbits recovering from experimental Spotted Fever by S virus strain, isolated in the State of São Paulo from a human case, contains antibodies capable not only of neutralizing other strains of viruses (F and L), isolated in the State of São Paulo from spontaneously infected *Ixodidae*, but also the BV virus of the new Mexican rickettsiosis.

In the same way, anti-BV serum of rabbits convalescing from the Mexican rickettsiosis under study, gave a fair protection against S virus of São Paulo Spotted Fever.

3. STUDY ON THE PROTECTION SHOWN BY SPOTTED FEVER VACCINATED GUINEA-PIGS AGAINST THE VIRUS OF THE NEW MEXICAN RICKETTSIOSIS

a) *Spencer-Parker vaccine (Butantan)* — Fourteen guinea-pigs were vaccinated subcutaneously with a single dose of 1 cc. of vaccine, batch No. 257, prepared with *Amblyomma cajennense* by the Spencer-Parker method at Butantan Institute (*). Fourteen days after vaccination, the animals were divided into two equal groups and inoculated intraperitoneally with 0.5 cc. of virus blood: the first group received BV virus and the second F virus. Two normal guinea-pigs were used as controls for each virus. All the animals remained under observation for 15 days.

The immunizing potency of this vaccine batch proved satisfactory (Table V), since among the 7 guinea-pigs inoculated with the homologous São Paulo F virus, 6 survived the infection without any thermic reactions and only 1 showed symptoms and died. No alterations of the peritoneal organs were found, except in the only guinea-pig (No. 256) which reacted with more or less typical rise of temperature.

The guinea-pigs vaccinated and inoculated with BV virus displayed an efficient protection in regard to mortality, but only a partial protection as to the evolution of the infection. This, however, was almost always benign, without very typical temperature curves.

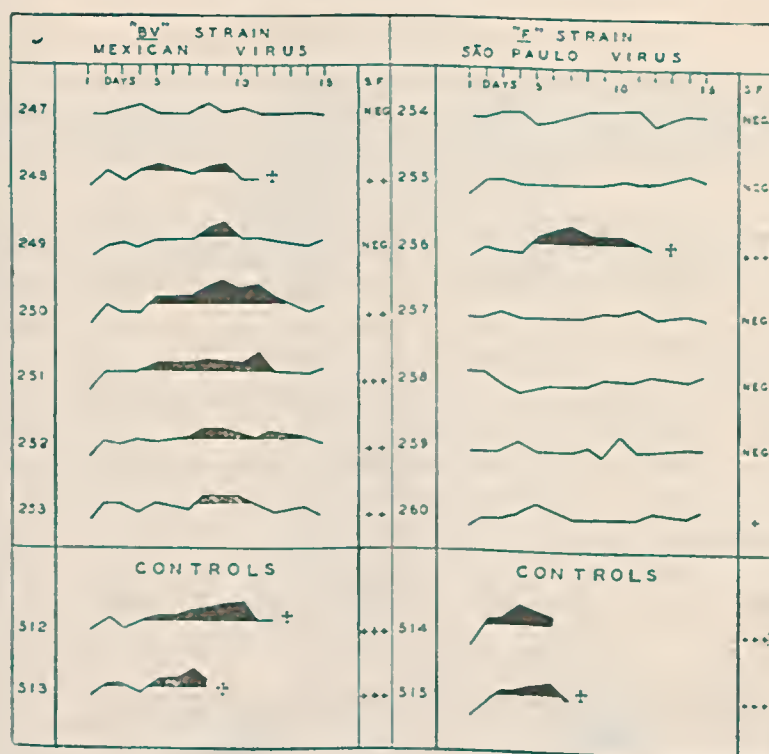
Only one guinea-pig (No. 247) showed complete protection: three others had a longer incubation period than the controls and temperature curves which remained high only for two days in one case, (No. 249) and for three days in another case (No. 253). Two animals reacted typically.

(*) For details concerning the technique of producing this vaccine see: Travassos, & Vallejo-Freire, A. Novos dados sobre a biologia de *Ixodidae*. Criação artificial do *Amblyomma cajennense* para o preparo da vacina contra a Febre Maculosa. *Mem. Inst. Butantan*, **18**:145-236, 1944/45.

Thus the Spencer-Parker vaccine prepared with São Paulo Spotted Fever rickettsiae is able to produce a fairly significant immunity in guinea-pigs against experimental infection with Mexican rickettsiosis virus.

A careful consideration of the quantitative variations of the virulence of the strains used in the protection tests might possibly explain whether this apparent variation is related to the presence of different antigenic fractions in both strains. Experiments with two doses of vaccine and the use of a titrated and more homogenous inoculum obtained from yolk sac membrane are hence suggested. (*)

TABLE V

Behaviour of guinea-pigs vaccined with a single dose of 1 cc. of São Paulo Spotted Fever vaccine, prepared in the Instituto Butantan with Amblyomma cajennense by the Spencer-Parker method, and thereupon inoculated with 0.5 cc. of virus-blood BV *(México) and* F *strain of São Paulo Spotted Fever*

(*) Guinea-pig virus-blood may contain from 50 to 1.000 infective doses per cc. In average it varies from 200 to 400.

b) *Cox vaccine (Rocky Mountain Laboratory, Hamilton, Montana)* — Twelve male guinea-pigs were vaccinated subcutaneously with 1 cc. of Cox vaccine against Rocky Mountain Spotted Fever prepared at the Rocky Mountain Laboratory, in Montana. One animal died two days after vaccination from a cause unrelated to the experiment. After 14 days, 6 guinea-pigs were inoculated intraperitoneally with 0.5 cc. of BV virus-blood (*7*) and five other with 0.5 cc. of L virus-blood *(104)*.

For each virus 2 male controls were inoculated with the same volume of inoculum, also through the peritoneal route.

As shown in table VI, the protection obtained was excellent regarding both BV (Mexican) and L (São Paulo) strains.

Only one of the guinea-pigs inoculated with Mexican virus and two of the L virus showed, at necropsy, marked spleen enlargement, giving evidence of inapparent infection. All the controls exhibited thermic and scrotal reactions and died; post-mortem there were the characteristic internal lesions.

TABLE VI

Guinea-pigs vaccinated with a single dose of 1 cc. of Cox vaccine, prepared by the Rocky Mountain Laboratory against Rocky Mountain Spotted Fever. Obtained protection against BV virus (Mexican rickettsiosis) and L strain of São Paulo Spotted Fever

In this test only male animals were used and a 100% scrotal reactions obtained with BV strain, thus enabling us to determine the influence of immunity induced by Cox vaccine in preventing the action of the rickettsiae upon the *tunica vaginalis* and the scrotum of the inoculated animals.

Among the vaccinated guinea-pigs not a single case of scrotal reaction was observed, not even the initial edema of the scrotal sac skin. Both the BV virus controls showed scrotal reactions of moderate intensity, with marked swelling, hemorrhages and necrosis of the scrotum skin. At necropsy, adherence of the tunica caused by inflammation or necrosis, desintegration of the polar fat of the testis and sometimes very discrete periorchitis were observed.

The tests here reported show the high protective value of the Cox vaccine, prepared with antigens from Rocky Mountain Spotted Fever cases, against the Mexican virus those isolated from Spotted Fever cases in São Paulo, as described against the São Paulo virus.

The neutralization tests leave, hence, little doubt concerning the identity of the viruses isolated in the United States, Brazil and Mexico.

4. WEIL-FELIX REACTION IN RABBITS

After determining the immunological identity between the BV strain of the Mexican virus and those isolated from Spotted Fever cases in São Paulo, as described above, we have studied the Weil-Felix reactions during the course of the experimental infection in rabbits. Bustamante and Varela (13), when studying the action of the Mexican virus upon the Weil-Felix reaction in rabbits, were unable to prove the existence of agglutinins in animals bled 11 days after infective inoculation.

In our experiments, several rabbits of about 2 kg. were inoculated intraperitoneally with infected guinea-pig virus-blood. Numbers 1 and 4 with 0.5 cc. the remaining with 2 cc. They were all bled 11, 15, 18, 25, 30 and 35 days later. In the majority of the animals, bleeding coincided with the end of the virus' circulation period, and all the rabbits showed either temperature of 40°C. or above or were at the beginning of recovery; the further bleedings were made several days after the fall of temperature. Only the rabbits that lived until the end of the test were taken into consideration. The partial results obtained and not included in the table were similar to those quoted.

The Weil-Felix reaction was performed with four races of *Proteus*: OX19, OX2, OXK and OXL. The first three, received from A. Felix, and the latter, from the Instituto Adolfo Lutz, São Paulo. They have been maintained for sometime at the Butantan Institute in plain agar, without condensation water. Before the preparation of the agglutinable suspensions, plate cultures were made, and S cultures used to inoculate ordinary agar, which was allowed to stand at 37°C. for 48 hours.

Suspensions of alive germs were used, at a concentration corresponding to MacFarland's tube 3, the suspensions being tested for roughness, according to White's test.

The tests were read macroscopically after 4 hours' inoculation in a water bath at 37°C., and again after 18 hours in the ice-box at 0°C.

Table VII gives the results of the Weil-Felix reaction in three rabbits inoculated with São Paulo Spotted Fever virus, and in four others inoculated with Mexican BV virus.

Agglutinins for *Proteus* OX19, OX2 and OXL were practically absent in the pooled sera from rabbits before the infective inoculation.

Only in one case a titer above 1:20 was recorded with the OX2 strain in the serum of rabbit No. 6 (1:80).

TABLE VII

Weil-Felix reaction in rabbits inoculated with Mexican and São Paulo virus

Virus	Rabbit	Temperatures inoculated rabbits (0–15 days)	Proteus	Agglutination titer: 0 days	11	15	18	25	30	35
São Paulo strain	1		CX19	0		320	320	160	80	
			OX2	10		160	160	80	40	
			CXK	10		20	10	10	10	
			CXL	0		320	320	80	80	
	2		CX19	0	80		80	80	10	10
			OX2	20	320		320	160	10	0
			CXK	80	40		40	40	20	10
			CXL	0	160		160	80	10	0
	3		OX19	0	40		40	80	40	40
			OX2	10	640		320	320	80	80
			CXK	320	640		640	160	40	20
			OXL	10	40		160	160	40	40
Mexican strain	4		CX19	0		160	80	80	40	
			OX2	0		1280	640	640	320	
			OXK	10		10	10	10	20	
			CXL	0		80	80	40	40	
	5		OX19	10	10		10	10	10	10
			OX2	0	80		80	80	20	0
			OXK	10	10		10	10	0	0
			OXL	0	10		10	10	10	10
	6		OX19	0	80		80	80	20	40
			OX2	80	160		320	320	320	80
			OXK	640	320		320	80	40	40
			OXL	20	160		320	80	80	80
	7		CX19	0	0		160	160	40	20
			CX2	10	10		160	40	10	10
			CXK	10	10		80	80	20	20
			OXL	10	10		320	160	20	20

The Weil-Felix reaction shows sometimes considerably high titers in normal rabbits with *Proteus* OXK; positive reactions are frequently found at the dilution of 1:80 or above. In three of the seven rabbits employed in this study, positive reactions were recorded at considerably high dilutions (1:80, 1:320 and 1:64). In connection with this observation, it must be emphasized that special care has been given to the technique of the reaction by using only emulsions free from H antigen and submitted to White's test, in order to exclude non-specific agglutination. Besides, all the reactions have been made separately on the day immediately following bleeding and repeated in a group test with the same bacterial suspension.

Felix (16) has also recorded sometimes high titers for OX2 and OXK, in normal rabbits, never exceeding, however, 1:50. This investigator does not consider these rabbits as "normal", suggesting that these high titers would be accounted for by infections provoked in rabbits by *Proteus vulgaris*, which possesses the same group antigens as the strains of *Proteus* X. Therefore, he advises, in studies on the Weil-Felix reaction, only the use of rabbit sera the titers of which do not exceed 1:20.

In the present paper we are including as additional evidence the results of the Weil-Felix reaction performed in rabbits, which have presented high titers for *Proteus* OXK before inoculation, in order to verify once more the non-influence of the action of São Paulo Spotted Fever virus and also of the virus of the new Mexican rickettsiosis upon *Proteus* OXK.

The Weil-Felix reaction was practically identical in the rabbits inoculated with BV virus-blood, and in those inoculated with São Paulo Spotted Fever virus. All the animals, with only one exception (No. 5), showed significant increase in agglutination titer for X19, X2 and XL strains. On the contrary, no significant increase in agglutinins for *Proteus* XK was verified except in the last rabbit, the original titer (1:10) of which increased to 1:80 eighteen days after inoculation; in the other rabbits no increase at all was recorded, but rather a decrease during the period of observation.

The highest titers for 0X19, 0X2 and 0XL were recorded on the 11th day after inoculation, corresponding to the final period of thermic reaction on the beginning of normalization of temperature. The agglutinin content remained stable for about 14 days and then decreased, reaching again the original titers between the 30th and 35th day after inoculation, or 20 to 25 days after the fall of temperature.

Usually, the titers for *Proteus* X2 strains were higher than for *Proteus* X19 in the rabbits inoculated with both virus strains. This fact has already been described for the São Paulo Spotted Fever virus by Travassos and Monteiro (17), and by Davis and Parker (19) for the Rocky Mountain Spotted Fever virus.

With *Proteus* OXL the differences were not frequent enough to be significant, and to a certain extent, a parallelism with the *Proteus* OX19 titers was observed.

Rabbit No. 7 did not present a conspicuous thermic reaction, showing temperature above 39.6°C. only on the 9th and 10th day. The Weil-Felix reaction on the 11th day was negative; on the second bleeding, however, 18 days after inoculation, in spite of the mildness of the reaction, agglutination titers increased for the four strains, but decreased much faster than in the other animals, which showed more serious symptoms and more typical temperature curve.

The possible meaning of these high OXK titers in our rabbits coming from the breeding place and their decrease during the stay in the laboratory after inoculation with São Paulo Spotted Fever virus is being submitted to further investigation.

DISCUSSION

The observations presented in this paper afford sufficient evidence that the virus of the new human rickettsiosis, isolated in Mexico, in the States of Sonora and Sinaloa by Bustamante and Varela, may be considered immunologically identical with the Spotted Fever viruses.

Cross immunity and neutralization tests carried out comparatively with São Paulo Spotted Fever virus and with the virus of the Mexican rickettsiosis, as well as the behaviour of the Weil-Felix reaction in experimentally inoculated rabbits, led to the conclusion that the rickettsiae responsible for both infections have a similar, if not identical antigenic structure.

This identity is evident in regard to virus strains obtained from human cases, as well as to strains of spontaneously infected *Amblyomma striatum* and *Amblyomma cajennense*.

The protection against the Mexican virus shown by guinea-pigs inoculated with a tick-vaccine against São Paulo Spotted Fever, and above all with an egg-vaccine against Rocky Mountain Spotted Fever, together with the proved immunological identity of the São Paulo and Rocky Mountain Spotted Fever viruses (7-11) and the known experimental transmission of the Mexican rickettsiosis by *Amblyomma striatum*, allows the inclusion of the etiological agent of the "Fiebre pinta" or "Fiebre de Choix" in the genus *Dermacentroxenus* Wolbach, 1919, in spite of the fact that up to now no spontaneously infected tick species has been found either in Sonora or Sinaloa.

If we adopt Philip's (18) classification of pathogenic rickettsiae, as a temporary nomenclature basis, the rickettsia of Mexican Spotted Fever would be included in the genus *Rickettsia* Rocha Lima, 1916, subgenus *Dermacentroxenus*

Wolbach, 1919, species *rickettsi* (Wolbach, 1919), i. e., the same found in Rocky Mountain Spotted Fever as well as in the Spotted Fevers occurring in Brazil and in Colombia.

According to Pinkerton and Hass (21), the differentiation between the rickettsia of the typhus group infections (*Rickettsia prowazeki* Rocha Lima, 1916) and those belonging to the genus *Dermacentroxenus* (name given originally by Wolbach (22) to the rickettsia responsible for Spotted Fever) could be based on the fact that the latter are visible within the nuclei of the infected tissues, whereas the former are only found in the cytoplasm.

According to Hass and Pinkerton (23), the rickettsia of "boutonneuse" fever should also be included in the genus *Dermacentroxenus*, since it is also found within the nuclei of the tissues of *Rhipicephalus sanguineus*, as well as in tissue cultures. This fact, together with the positive cross immunity tests between the "boutonneuse" and the Rocky Mountain Spotted Fever (24), enabled the authors to place the so called "boutonneuse" fever in the Spotted Fever group (*). It is also possible by means of cross immunity tests, to enroll South African tick-bite fever among infections of this group, which quite increases the list of Spotted Fevers outside the American continent.

For the Spotted Fevers occurring outside the United States, several names have been proposed, recalling either the geographic distribution of the disease ("Fiebre de Tobia", "Fiebre de Choix", "Kenya fever", etc.), or certain striking symptom, such as in "Fiebre pinta", "Fiebre petequial", "Fièvre boutonneuse". Other denominations such as "São Paulo and Minas Gerais exanthematic typhus", may be considered as misgiven.

In the last case, the name "Exanthematic typhus", brings practical inconveniences for the establishment of an adequate treatment and control of the disease. To those not acquainted enough with the characteristics of the rickettsiosis most frequently found in Brazil, that name reminds infections of the typhus group, rickettsioses caused by *Rickettsia prowazeki* and transmitted through the bite of human louse or flea. Laymen and even physicians of certain rural regions, when facing the Spotted Fever diagnosis made by official laboratories under the heading "Exanthematic typhus" have often taken wrong or unnecessary epidemiological measures.

The denomination "Spotted Fever" should be adopted for all exanthematic typhus infections transmitted by *Ixodidae* and immunologically related to the

---

(*) Recently, Plotz, Reagan and Wertman (25) by means of complement fixation reaction with rickettsial antigen of tissue cultures, were able to distinguish the boutonneuse fever virus from that of the Rocky Mountain Spotted Fever.

rickettsioses formerly found in the Rocky Mountain region, in the United States. The name "Spotted Fever", although derived from symptoms common to several infections, will not bring confusion with other infectious diseases, not even with other rickettsiosis of the typhus group. Its use in the medical literature already reminds a well studied and individualized morbid entity.

Hence, for priority's reason, all infections that are or will be related to the so called Rocky Mountain Spotted Fever should be called "Spotted Fever" (**). If we use the name "Rocky Mountain Spotted Fever" for other rickettsiosis of this group, we will have to face the significant inconvenience of a geographic limitation, preventing its generalization.

For the same reason, we cannot adopt the denomination "American Spotted Fever", suggested by Bustamente and Varela, nor any other name which includes in its designation any specification concerning a city, region, country or continent, since as we have pointed out, there are or might be recorded tick transmitted rickettsioses in countries outside the American continent, the viruses of which present an immunological behaviour related to that of the Spotted Fever group.

There is "Spotted Fever" in the Rocky Mountains (United States), in São Paulo, Minas Gerais (Brazil), in Tobia (Colombia), in Sonora, Sinaloa (Mexico), etc., as well as there is Malaria, Yellow Fever, etc. in so many regions of the world.

It is probable that new foci of Spotted Fever will be detected mainly in those regions, where *Ixodidae* are abundant and can feed on man. Being an infection which essentially strikes rural zones, Spotted Fever is usually diagnosed only after serious cases are reported in sufficient number to attract attention, such as has been the case in Brazil, in Colombia and now in Mexico. In Brazil the new foci that presented a considerable number of cases, could usually be traced back to a loss of balance in the normal tick biology, due to the introduction of means which favoured an exaggerated increase of its population.

On the other hand, as soon as the disease is better known clinically by a larger number of physicians and the means for laboratory diagnostic become available, as in the United States and now in Brazil, a much larger number of sporadic cases are reported, and cases in new regions identified. In the same way and for the same reason, it has been possible to observe benign cases of Spotted Fever and to isolated less virulent virus strains from individuals, in whom other wise the disease would not have been recognized.

(**) In Portuguese "Febre Maculosa", in Spanish "Fiebre manchada".

ABSTRACT

The paper deals with the study of the immunological relationship between a virus isolated by Bustamante and Varela from a new rickettsiosis recorded in Mexico, in the States of Sonora and Sinaloa, and other strains of Spotted Fever virus. Following results are reported:

1. Guinea-pigs surviving infection with São Paulo Spotted Fever virus displayed complete protection when reinoculated with Mexican virus. Furthermore, the pooled sera obtained from these guinea-pigs before reinoculation showed neutralizing antibodies against São Paulo Spotted Fever virus.

2. Convalescent serum from rabbits infected with São Paulo or Mexican virus exhibited protective antibodies against the homologous, as well as against the heterologous strain.

3. Guinea-pigs inoculated with a 1 cc. dosis of a Spencer-Parker vaccine prepared at Butantan Institute (São Paulo, Brazil), with local Spotted Fever virus strains, proved partially immune against the virus of the new Mexican rickettsiosis.

4. Guinea-pigs vaccinated with a 1 cc. dosis of a Cox vaccine prepared at the Rocky Mountain Laboratory (Hamilton, Montana, U. S. A.) against Rocky Mountain Spotted Fever, showed solid immunity to the Mexican virus.

5. The course of the Weil-Felix reaction is identical in rabbits experimentally infected with the Mexican virus or with the São Paulo Spotted Fever virus. In both cases there is a rise of the agglutination titer for the *Proteus* OX19, OX2 and OXL strains, reaching the maximum at end of the fever reaction or beginning of recovery, remaining stable for a few days and decreasing rapidly within 30 or 35 days after inoculation or within 20 or 25 days after recovery. No significant increase of agglutination for strain OXK was observed. In general the titer was higher for *Proteus* OX2, than for OX19 and OXL.

The experiments reported allow the conclusion that an immunological identity exists between the viruses of Mexican Sonora and Sinaloa rickettsiosis and São Paulo Spotted Fever.

RESUMO

Neste artigo são estudadas algumas propriedades imunológicas do virus isolado por Bustamante e Varela de doente de uma nova rickettsiose verificada no Mexico nos Estados de Sonora e Sinaloa, em comparação com amostras de virus da febre maculosa. São os seguintes os resultados obtidos:

1. Cobaios sobreviventes da infecção provocada com virus de febre maculosa, isolado no Estado de São Paulo, mostram sólida imunidade perante reinoculações feitas com virus mexicano. Mistura de soros obtidos destes mesmos cabaios no periodo da convalescença e antes da reinoculação apresentaram anticorpos neutralizantes ativos para amostras de virus de febre maculosa de São Paulo.

2. Soros de coelhos convalescentes de infecção com virus de São Paulo ou do México apresentaram anticorpos protetores, tanto para o virus homólogo como para a amostra heteróloga.

3. Cobaios inoculados com uma dose de 1 cm^3 de vacina tipo Spencer-Parker, preparada no Instituto Butantan com amostras de virus isoladas em São Paulo, mostram-se parcialmente protegidos contra o virus da nova rickettsiose mexicana.

4. Cobaios vacinados com uma dose de 1 cm^3 de vacina tipo Cox, preparada no Rocky Mountain Laboratory, nos Estados Unidos, contra a febre maculosa das Montanhas Rochosas, apresentaram sólida proteção às inoculações feitas com virus mexicano.

5. A reação de Weil-Felix, estudada em coelhos experimentalmente infectados com virus mexicano, mostrou idêntico comportamento ao que se verifica com amostras de virus da febre maculosa de São Paulo, isto é, elevação do título aglutinante para as amostras de *Proteus* OX19, OX2 e OXL, atingindo o máximo no fim da reação febril ou início da convalescença, mantendo-se estável durante alguns dias e decaindo rapidamente dentro de 30 a 35 dias a contar da inoculação ou sejam entre 20 e 25 dias do início da convalescença. Não houve aumento significativo de aglutinação para a amostra OXK. Em geral o título foi mais elevado para *Proteus* OX2, do que para OX19 e OXL.

Estas experiencias permitem concluir pela identidade imunológica existente entre a amostra de virus isolada no Mexico e as amostras provenientes de casos de febre maculosa em São Paulo.

BIBLIOGRAFIA

1. *Piza, J. de Toledo; Meyer, J. R. & Gomes, L. Salles.* Typho exanthematico de São Paulo. São Paulo, s.c.p., 1932.
2. *Monteiro, J. Lemos.* Estudos sobre o typho exanthematico de São Paulo, *Mem. Inst. Butantan*, **6**:3-135, 1931.
3. *Magalhães, Octavio.* Tifo exantematico de Minas Gerais, *Brasil Medico*, **51**(35):871-873, 1937.
4. *Tostes, J. & Bretz, G.* Sobre uma rickettsiose observada em zona rural do Estado do Rio de Janeiro, *Brasil Medico*, **55**:789-794, 1941.
5. *Davis, G. E. & Parker, R. R.* Additional studies on the relationship of the virus of Rocky Mountain spotted fever and São Paulo exanthematic typhus, *Public Health Rep.*, 48:1006-1011, 1933.

6. *Dyer, R. E.* Relationship between Rocky Mountain spotted fever and exanthematic typhus of São Paulo. *Public Health Rep.*, 48:521-522, 1933.

7. *Parker, R. R. & Davis, G. E.* Protective value of convalescent sera of São Paulo exanthematic typhus against virus of Rocky Mountain spotted fever, *Public Health Rep.*, 48:501-507, 1933.

8. *Travassos, J. & Dias, E.* Febre maculosa. Identidade imunologica do virus de Minas Gerais, São Paulo e das Montanhas Rochosas, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 34: 149-179. 1939.

9. *Parker, R. R. & Davis, G. E.* Further studies on the relationship of the viruses of Rocky Mountain spotted fever and São Paulo exanthematic typhus. *Public Health Rep.*, 48:839-843, 1933.

10. *Patiño, L.; Afanador, A. & Paul, J. H.* A spotted fever in Tobia, Colombia. *Amer. J. Trop. Med.*, 17:639-653, 1937.

11. *Patiño, L.* Nuevas observaciones sobre un tercer foco de fiebre petequial en el hemisferio americano, *Rev. Fac. Medicina de Bogotá*, 10:359-376, 1941.

12. *Vallejo-Freire, A.* 1945). *Mem. Inst. Butantan, in press.*

13. *Bustamante, M. E. & Varela, G.* Una nueva rickettsiosis en Mexico, *Rev. Inst. Salubridad y Enferm. Trop.*, 4:198-200, 1943.

14. *Bustamante, M. E. & Varela, G.* Caracteristicas de la fiebre manchada de las Montañas Rochosas en Sonora y Sinaloa, Mexico, *Rev. Inst. Salubridad y Enferm. Trop.*, 5:129-134, 1943.

15. *Travassos, J. & Vallejo-Freire, A.* Vacina de Cox contra a febre maculosa, *Rev. Brasil. de Biol.*, 4:161-166, 1944.

16. *Felix, A.* The rabbit as experimental animal in the study of the typhus group of viruses, *Tr. Roy. Soc. Trop. Med. a. Hyg.*, 26:365-378, 1939.

17. *Travassos, J. & Monteiro, J. Lemos.* Contribuição ao estudo da reação de Weil-Felix na infecção experimental pelos virus do "typho exanthematico" de São Paulo e febre maculosa das Montanhas Rochosas, *Mem. Inst. Butantan*, 8:57-80, 1933-34.

18. *Philip, C. B.* Nomenclature of pathogenic rickettsiae, *Amer. J. Hygiene*, 37:301-309. 1943.

19. *Davis, G. E. & Parker, R. R.* A comparative study of two strains of Rocky Mountain spotted fever virus with special reference to the Weil-Felix reaction, *Public Health Rep.*, 53:1525-1531, 1938.

20. *Parker, R. R.; Kohls, G. M. & Steinhaus, E. A.* Rocky Mountain spotted fever: spontaneous infection in the tick *Amblyomma americanum*, *Public Health Rep.*, 58:721-729, 1943.

21. *Pinkerton, H. & Hass, G. M.* Spotted fever III. The identification of *Dermacentroxenus rickettsi* and its differenciation from non-pathogenic rickettsiae in ticks, *J. Exper. Med.*, 66:729-739, 1937.

22. *Walbach, S. B.* Studies on Rocky Mountain spotted fever, *J. Med. Res.*, 41:1-197. 1919.

23. *Hass, G. M. & Pinkerton, H.* Spotted fever. II. An experimental study of fièvre boutonneuse, *J. Exper. Med.*, 64:601-623, 1936.

24. *Badger, Z. F.* Rocky Mountain spotted fever and boutonneuse fever. A study of their immunological relationship, *Public Health Rep.*, 48:507-511, 1933.

25. *Plotz, H., Reagan, R. L. & Wertman, K.* Differentiation between boutonneuse and Rocky Mountain spotted fever by means of complement fixation, *Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med.*, 55:173-176, 1944.

AÇÃO DO VENENO DOS ESCOLOPENDROMORFOS DO BRASIL SÔBRE ALGUNS ANIMAIS DE LABORATÓRIO

POR WOLFGANG BUECHERL

(Do Laboratório de Ofiologia e Zoologia Médica, Instituto Butantan, S. Paulo, Brasil)

INTRODUÇÃO

Nos periódicos e nas publicações que versam sôbre os venenos animais e seu real ou possível dano aos mamíferos superiores e ao homem, pouco encontramos em relação aos venenos dos *Escolopendromorfos*. Ainda mesmo assim, os poucos relatos são frequentemente contraditórios, afirmando autores como Plateau, D'Herkulais e Briot, que tanto o veneno dos *Escutigerídios*, como o dos *Litobiídios* e o das *Escolopendras*, têm apenas ação local, traduzida por vermelhidão, edema e necrose, sem outras consequências maiores, enquanto que outros autores não hesitam em atribuir à mordida das grandes escolopendras *casos humanos de morte*. Segundo êstes autores o veneno das escolopendras não teria sòmente ação local, mas também uma ação geral sôbre o organismo, sendo esta última de maior importância do que a primeira.

Assim E. St. Faust relata casos humanos mortais devido às mordidas de escolopendras da India, provàvelmente da *Escolopendra subspinipes subspinipes*.

Pawlowsky, E. N. (2) admite inicialmente casos de intoxicação grave; mais tarde, porém, fazendo experiências, na Criméia, com veneno de *Scolopendra cingulata* sôbre o organismo humano, conclui da pouca toxidez do veneno desta espécie, dizendo que há *apenas uma reação local*, com inflamação aguda, que aumenta de intensidade nas primeiras 4-5 horas depois da mordida e se carateriza por dôres agudas, edemas e pápulas, que podem persistir até 4 dias (3) Pawlowsky, Stein e Venzmer, G. (4) fala de 1 caso fatal, ocorrido com uma criança de 7 anos, mordida na cabeça por uma escolopendra das Filipinas.

Barthmeyer, A. e Schmalfuss, H. (5) falam, por alto, de casos mais ou menos graves.

Porter, C. (6) repete que a mordida de *Scolopendra gigantea* L. póde determinar a morte no homem.

Machado, O. (7) relata dois casos humanos de mordeduras por *Scolopendra subspinipes*, concluindo que o veneno desta espécie tem apenas ação local, traduzida por dôr mais ou menos acentuada, edema e necrose leve, na área atingida.

Entregue para publicação em 10 de abril de 1946.

MATERIAL E METODOS

O Instituto Butantan vem recebendo dos fornecedores de animais venenífero localizados principalmente nos Estados do Sul do Brasil, periòdicamente, q lópodos.

Dêstes temos separado as formas mais frequentes, e de maiores proporçõe porque temos observado que sómente as espécies superiores a 5cm podem perfura a pele humana e assim tornarem-se perigosas.

Pela frequência e pelo tamanho temos criado em viveiros as seguintes e pécies:

Scolopendra viridicornis NEWP. 1844	16-19 cm de comprimen
Scolopendra subspinipes LEACH. 1815	11-18 cm de comprimen
Otostigmus scabricauda HUMB. & SASS. 1870	6-7 cm de comprimen
Cryptops iheringi BROEL. 1902	6-9 cm de comprimen
Otocryptops ferrugineus L. 1767	5-7 cm de comprimen

Cada vez que juntamos 10 exemplares adultos (portanto 20 glândulas de ve neno), extraimos as glândulas que são secadas a 60° e em seguida emulsionada em solução. O soluto repousa durante a noite em geladeira e é filtrado no di seguinte, e imediatamente injetado em animais de laboratório, tanto por via ve nosa como subcutânea.

Ao mesmo tempo realizamos observações sôbre a própria mordedura dêste escolopendromorfos em camundongos e cobáios, em regiões prèviamente depilada

Realizamos também algumas experiências em nós mesmos, deixando-nos mor der sucessivamente e com um intervalo de 2 meses, no antebraço, por *scabricaud iheringi* e *ferrugineus*.

Morfologia do aparelho inoculador e glândula de veneno

Na *Scolopendra viridicornis*, como aliás em todos os quilópodos, a glându de veneno está localizada nos dois telopóditos das forcípulas. As forcípulas, em bora embriològicamente devam ser consideradas como sendo o primeiro par de patas de tronco, sofreram uma transformação fisiológica e morfológica tal que nos animais adultos, fazem parte dos apêndices cefálicos (Fig. 1).

As *coxas* das forcípulas estão soldadas ao *esternito, formando o "coxoster num"*, cuja parte anterior está subdividida em duas placas, armadas de dente robustos. Assim o massiço do coxosternum vem a formar um aparelho de mas tigação, móvel no sentido de trás para diante, e tendo como antagonistas os den tes do lábio superior.

Os *fêmures* das forcipulas formam um artículo robusto (Fig. 1), provido, no lado interno, de uma apófise denticulada.

A *tibia* e o *primeiro tarso* têm a forma de dois anéis, muitos largos e de pouco comprimento (Fig. 1).

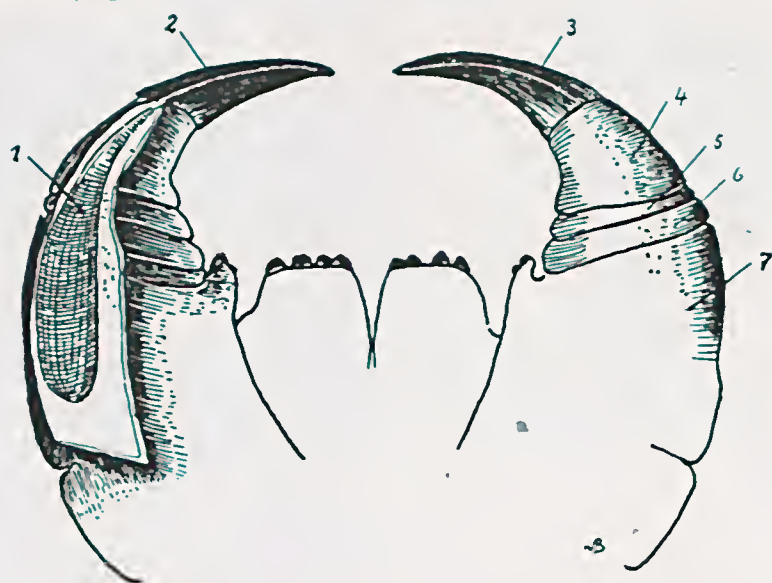



FIG. 1

Scolopendra viridicornis — Forcipulas com glândula venenifera e aparelho inoculador (Kieferfussegment). 1. Glândula venenifera; 2. Canal eferente; 3. Ùngula (pinça inoculadora); 4. Segundo tarso; 5. Primeiro tarso; 6. Tibia; 7. Fêmur. (Tamanho natural: 12/12 cm).

O *segundo tarso* é transformado no *aparelho inoculador* do veneno. É dez a vinte vêzes maior do que os segundos tarsos das outras pernas e sua "úngula" é constituida por uma peça de quitina muito espessa e soldada imóvelmente ao tarso. A úngula ou ferrão arpesenta uma ponta aguda e nesta ponta, no lado superior, se encontra o *orifício* por onde sai o veneno, quando a escolopendra crava o ferrão em alguma vitima.

As forcipulas de todos os quilópodos (vide Fig. 1 e Fotos 2, 3 e 4) apenas se articulam no sentido horizontal, de fóra para dentro, como aliás nas aranhas verdadeiras (em oposição às aranhas caranguejeiras). Internamente, tanto os fêmures como as tibias e o primeiro tarso, apresentam potentes feixes musculares flexores e extensores, que correm em sentido transversal, com pontos de inserção na base dos artículos seguintes.

Entre êstes feixes musculares (estriados), porém mais deslocada para o lado esterno dos três artículos, encontra-se a *glândula de veneno*. E' de importância notar que o corpo da glândula de veneno está rodeado nos três articulos, pelos feixes musculares, de maneira que, no momento da mordida, havendo dobramento

dos artículos de fóra para dentro, os mesmos feixes exercem naturalmente pressão sôbre o corpo da glândula, determinando o esvasiamento desta e impelindo o veneno através do canal eferente.

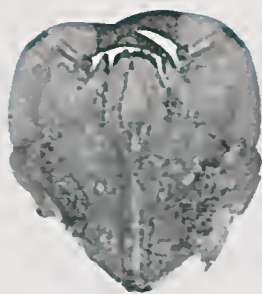



FOTO 2

Otostigmus scabricauda Humb & Sanss — ("Kieferfussegment" — segmento dos maxilópodos com aparelho inoculador do veneno). Tamanho natural: 0,5/0,4 cm.

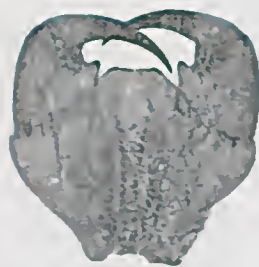



FOTO 3

Cryptops iheringi Broelemann — maxilópodos com aparelho inoculador de veneno. Tamanho natural: 0,8/0,7 cm.

As glândulas de veneno de *Scolopendra viridicornis* (como também as dos outros *Escolopendromorfos*) têm o aspeto de ampolas cilíndricas, de cuja parte anterior parte o canal excretor. Este canal se prolonga para dentro do corpo glandular (vide Foto 5 e 6). As glândulas sempre são independentes, sem aderências aos feixes musculares vizinhos.

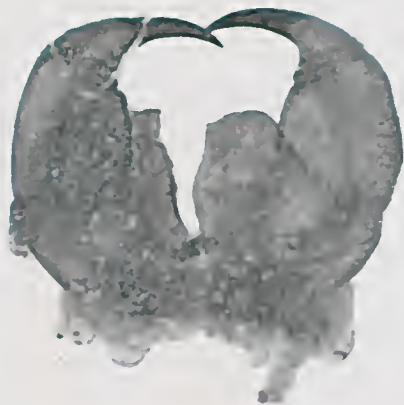



FOTO 4

Otocryptops ferrugineus ferrugineus L. — Maxilópodos com aparelho inoculador do veneno. Tamanho natural: 0,8/0,7 cm.

Em *s.v. viridicornis* o comprimento da glândula de veneno é de 7,5 mm. e o diâmetro, na parte mais grossa, de 1 mm. O canal excretor, na parte livre, é de 7 mm. As mesmas medidas valem também no tocante à *S.subspinipes subspinipes*. Em *Otostigmus scabricauda*, *Cryptops iheringi* e *Otocryptops ferrugineus* o canal

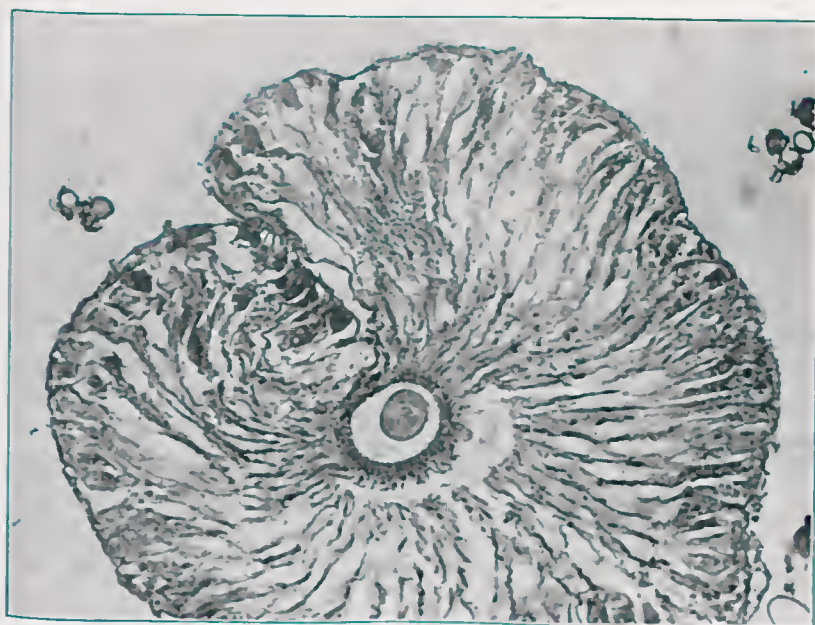



FOTO 5
Corte transversal pela glândula do veneno de *S. viridicornis* — Coloração segundo o método de Mallory. Observa-se o canal eferente central, cuja parede quitinosa está perfurada por finos canalículos radiais, nos quais desembocam os ácinos, também dispostos radialmente em volta do canal central. (Grande aumento).

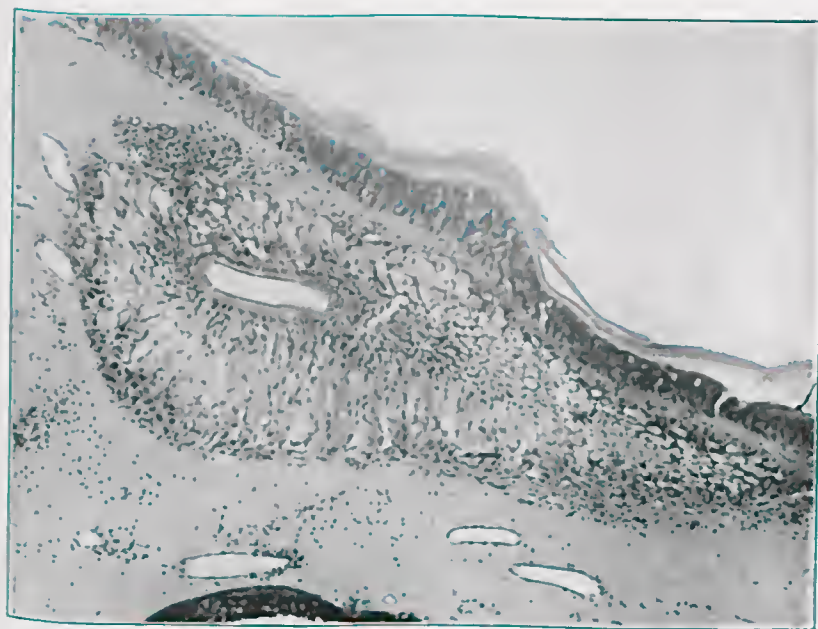



FOTO 6
Corte transverso-tangencial pela glândula de veneno de *S. viridicornis* — Coloração com Hematoxilina-eosina. Vêm-se bem os canalículos que estabelecem comunicação entre os ácinos e o canal central eferente. Igualmente podem-se observar os ácinos e a disposição das células secretoras do veneno em volta dos ácinos, com as 3 formas de núcleos. (Grande aumento).

excretor tem 3 mm. de comprimento, e a glândula propriamente dita 4 mm. comprimento por 0,4 de diâmetro.

O canal excretor continua dentro do corpo da glândula, formando um tu que se alarga no fim, formando assim um reservatório de veneno.

Em volta dêste tubo estão dispostos os ácinos em ordem radial. Ao long das paredes dos ácinos encontram-se as células secretas. A glândula é envo por uma membrana basal não muito espessa.

a) Canal excretor — Em cortes histológicos (fixados em formol e cora com Hematoxilina-eosina ou pelo método de Van Gieson ou ainda pelo Mallory o canal excretor aparece dotado de quitina espessa, exocuticular. A quitina, p rém, não é contínua como na cutícula do corpo, mas está perfurada, durante t o trajeto da glândula, por finos canais, também de natureza quitinosa, de posiç radial, e que dão acesso aos ácinos. Os canais estão abertos de maneira que veneno, que vem dos ácinos, pode fluir livremente dentro do canal central. canal excretor é estreito no começo, alargando-se progressivamente depois e at gindo seu diâmetro maior dentro da glândula.

b) Ácinos — Os ácinos estão dispostos radialmente em volta do ca excretor, central terminando livremente nêste por meio dos finos canais su ditos. Cada ácino tem apenas um canalículo. Cada ácino tem uma membra envolvente, muito delgada, de natureza igualmente cuticular. Os ácinos se apr sentam ora vacuolizados ora repletos de um líquido uniformemente corado, p dendo haver também finas granulações.

c) Células glandulares — As células glandulares se encontram em v dos ácinos. São elas que elaboram a secreção venenosa, que difunde para den dos ácinos atravéz da membrana dêstes. Em cortes histológicos podem ser servadas as diversas fases de elaboração da secreção. Assim observam-se lulas com núcleos longos, cuja cromatina está dividida em pequenos grumos com citoplasma práticamente invisível e com vacúolos. Esta forma de célu se encontra pricinpalmente em volta do canal excretor e é a mais numerosa.

Em seguida a esta forma encontramos, também em zona radial, células cretoras com núcleos ovais, cuja cromatina está muito bem visível e desfeita flocos relativamente grandes. Também nêste caso o citoplasma está quase visível.

Na parte distal finalmente encontramos células secretoras em citoplasma m to bem visível, obedecendo o núcleo à posição central e sem diferenciação cromatina. Êste número de células é menos frequente do que os dois pri ros tipos.

Claro está que se trata de um e mesmo tipo de célula secretora. O aspe diferente se deve únicamente ás diversas fases, da formação da secreção, do

mazenamento da secreção e da expulsão da secreção, fases estas em que tomam parte ativa tanto o núcleo como o citoplasma celulares.

d) Membrana própria — A membrana própria, aliás da mesma origem como a membrana basal das células da epiderme, é muito bem visível, si bem que não seja muito espessa e envolve èsternamente todo o corpo glandular.

Em todos os escolopendromorfos, acima mencionados, temos encontrado o mesmo aspecto histológico da glândula.

Ação do veneno dos escolopendromorfos sôbre animais de laboratório

a) Sôbre Camundongos — A *Scolopendra viridicornis*, quando morde um camundongo, injeta geralmente muito veneno, pois não costuma largar mais a sua vítima pelo menos durante uns cinco minutos. Em regra geral, porém, ela se afasta do comundongo, sendo até êste o animal que procede em primeiro logar ao ataque e levando muitas vêzes a vitoria. Mesmo a *S. viridicornis* completamente adulta só com muita dificuldade consegue enterrar suas presas na pele do camundongo, mas, uma vez cravadas, o camundongo *morre sempre sob a ação do veneno*. 36 camundongos, com peso mêdio de 20 g. mordidos perto da cauda, morreram no tempo médio de 3 minutos, seguindo-se à morte a rigidez imediata.

A Scolopendra subspinipes, mesmo quando tem mais de 15 cm de comprimento, não consegue geralmente segurar um camundongo, de maneira que só raras vêzes pode enterrar as forcípulas de uma maneira tal que lhe seja possivel injetar bastante veneno. Mas conseguido isto, o camundongo também é intoxicado e morre entre 5 a 8 minutos.

Fazendo a mesma lacraia morder mais do que um camundongo no mesmo dia ou nos dias imediatos, já não existe veneno suficiente para que a vítima morra, embora apresente sintomas de intoxicação mais ou menos graves. Nos camundongos sobrevivente observam-se no local da picada hiperemia, endurecimento e ligeira necrose superficial, necrose esta que mais tarde desaparece, sém deixar vestigio. O veneno de *Scolopendra subspinipes* é, pois, menos ativo sôbre camundongos do que o de *viridicornis*, determinando êste úlitmo também dôr mais viva, pois os camundongos gritam horas a fio, quando mordidos.

Otostigmus scabricauda, *Cryptops iheringi* e *Otocryptops ferrugineus*, quando colocados no mesmo vidro em que se acha um camundongo não conseguem nunca morder o camundongo; pelo contrário procuram evitar o adversário e fugir dêle, do qual terminam vitimas.

b) *Sôbre cobáios* — De 10 cobáios, de tamanho médio, mordidos em região previamente depilada, por *Scolopendra viridicornis*, só morreram 4, dentro de 24 hs, sobrevivendo outros 6, embora todos estivessem durante 1 dia sèriamente intoxicados. Durante as primeiras 4 hs gritaram continuamente de dôr

FOTO 1

Scolopendra viridicornis viridicornis Newp. — Tamanho natural de um macho adulto.

e se recusaram a tomar alimento durante o dia seguinte. Os mortos apresentaram *rigidez sempre crescente.*

A *Scolopendra subspinipes,* mordendo igualmente 6 cobáios depilados, não conseguiu matar nenhum.

Com as outras três espécies de escolopendromorfos não tentamos a experiência.

Os cobáios sobreviventes, tanto mordidos por *viridicornis* como por *subspinipes,* apresentavam sempre *edema* e, depois, *necrose superficial,* persistenté durante vários dias, às vêzes duas semanas, sarando finalmente sem deixar vestígio.

c) *Injeções venosas e subcutâneas do veneno dos escolopendromorfos* — Das 5 espécies de escolopendromorfos foram conservados em viveiros de cada vez 10 animais adultos, de maneira que se poude extrair ao todo 20 glândulas de veneno. Estas glândulas foram secadas a 60°, emulsionadas em solução salina isotônica; depois de um repouso de 24 hs em geladeira foi filtrada e injetada imediatamente.

20 glândulas de *Scolopendra viridicornis* em 40 cm³ de solução salina.

Volume	Via introd.	Animal	Morte	Tempo de morte	Sobreviventes
1 cm³	veia	5 camundongos	todos	20-32 segundos	
0,5 cm³	veia	5 camundongos	todos	30-49 segundos	
0,25 cm³	veia	5 camundongos	todos	1-2 minutos	
[illegible],125 cm³	veia	1[illegible] camundongos	todos	7-9 minutos	
Diluição de 1:10 em solução salina					
1,000 cm³	veia	6 camundongos	todos	8-13 minutos	
0,800 cm³	veia	5 camundongos	todos	3-7 horas	
0,500 cm³	veia	5 camundongos	2	18 horas	3
0,250 cm³	veia	5 camundongos			5
Solução-mãi					
1 cm³	intramuscular	4 camundongos	todos	32 minutos	
0,75 cm³	intramuscular	4 camundongos	todos	1 h., 12 min.	
[illegible],50 cm³	intramuscular	4 camundongos	2	7 h.	2
0,25 cm³	intramuscular	4 camundongos			4
5,[illegible]0 cm³	veia	4 pombos	todos	30 minutos	
4,00 cm³	veia	4 pombos	todos	65 minutos	
3,00 cm³	veia	4 pombos	2	18 horas	2
2,00 cm³	veia	3 pombos	3	18 horas	
[illegible].00 cm³	intramuscular	4 cobaios	todos	75 minutos	
[illegible] cm³	intramuscular	4 cobaios	todos	19 horas	
4,00 cm³	intramuscular	4 cobaios	1	24 horas	3
3,00 cm³	intramuscular	4 cobaios			4

A ação local do veneno de *Scolopendra viridicornis* é quase nula, isto é, só se verifica, nos animais acima, ligeiro edema local da injeção, havendo um nódulo durante alguns dias. Mais tarde êste nódulo desaparece, sem deixar vestígios. A dôr deve ser intensa, pois os cobáios gemem horas a fio.

A *ação geral* do veneno se manifesta principalmente sôbre a *respiração*, ocorrendo a morte sempre por *paralisia respiratória*, seguida de tetania. Pode-se concluír, daí, que o princípio tóxico da *Scolopendra viridicornis* é uma *neurotoxina*, com pouca ação local mas com bastante ação sôbre o organismo geral, especialmente sôbre o sistema nervoso.

O pombo, logo depois de receber na veia uma dose letal, começa a apresentar os seguintes sintomas: salivação abundante; movimentos de deglutição; piscar de olhos. Depois cai para o lado, apoiando-se sôbre uma aza distendida. Levanta muito a cabeça, esticando completamente o pescoço e procurando assim absorver ar. Finalmente a cabeça cai para trás, seguindo-se a queda do pombo de costas. A morte ocorre por paralisia respiratória.

Em camundongos e cobáios verifica-se o mesmo.

20 glândulas de *Scolopendra subspinipes* em 40 cm³ de solução salina:

Volume	Via introd.	Animal	Morte	Tempo de morte	Sobreviventes
1,00 cm³	veia	5 camundongos	todos	30 seg.-1 min.	
0,75 cm³	veia	5 camundongos	todos	1 e 1 min.	
0,50 cm³	veia	5 camundongos	todos	3 min.	
0,25 cm³	veia	5 camundongos	todos	8 min.	
0,125 cm³	veia	5 camundongos	todos	2 horas	
Diluição de 1:10 em solução salina					
1,00 cm³	veia	5 camundongos	3	12 horas	2
0,80 cm³	veia	5 camundongos			5
Solução-mãi					
2,00 cm³	subcutâneo	4 camundongos	3	14 horas	1
1,00 cm³	veia	4 camundongos			4
4,00 cm³	veia	3 pombos	1	18 horas	2
5 cm³	intramuscular	4 cobáios	2	12 horas	2
4 cm³	intramuscular	4 cobáios			4

Nota: A dosagem do veneno de *Scolopendra subspinipes* em pombos foi feita por J. B. Arantes, chefe do serviço de antivenenos, pelo que muito agradecemos.

Os sintomas de morte dos animais, quando o veneno é injetado na veia, demonstram que também a toxina de *Scolopendra subspinipes* age pouco *localmente*

(edema, inflamação, hiperemia, necrose leve, superficial, readsorvida sem deixar cicatriz), sobrevindo a morte sempre por *paralisia respiratória*. O veneno da *Scolopendra subspinipes*, ao contrário do que se deveria supor, em conformidade com a parca literatura (citada no começo) sôbre casos fatais atribuidos à mordida por esta lacraia, na Índia, é menos ativo do que o da *Scolopendra viridicornis*. Talvez a subespécie brasileira de *subspinipes*, muito menos agressiva aliás do que a *viridicornis*, seja menos venenosa do que a indiana.

A emulsão de 20 glândulas de *Otostigmus scabricauda* em 40 cm³ de solução salina forneceu o seguinte resultado: —

1 cm³	veia	4 camundongos	mortos dentro de 2 minutos
0,5 cm³	veia	4 camundongos	mortos dentro de 4 minutos
0,25 cm³	veia	4 camundongos	mortos dentro de 6 minutos
0,125 cm³	veia	4 camundongos	mortos dentro de 17 minutos
Diluição de 1:10 em solução salina			
1 cm³	veia	4 camundongos	mortos dentro de 19 minutos
0,75 cm³	veia	4 camundongos	mortos dentro de 2 horas
0,50 cm³	veia	4 camundongos	mortos dentro de 17 horas
0,25 cm³	veia	4 camundongos	2 mortos e 2 vivos
Solução-mãi			
1 cm³	subcutânea	4 camundongos	mortos dentro de 12 minutos
2 cm³	subcutânea	4 camundongos	mortos dentro de 4 horas
0,50 cm³	subcutânea	4 camundongos	1 morto e 3 vivos

Na injeção subcutânea, depilando-se previamente a região, verifica-se que o veneno de *Otostigmus scabricauda* é de ação local, igualmente pouco pronunciada, havendo, contudo, uma necrose um tanto mais profunda e mais difícil de readsorbção do que a surgida pela mordida de *Scolopendra viridicornis* e *subspinipes*. As duas fotografias anexas a êste trabalho mostram o nosso braço, onde, em experiências, nos deixamos morder por um *Otostigmus scabricauda* (Fotos 7, 8). A dôr é instantânea e se traduz por um queimor local vivo e intenso, havendo no local da mordida apenas vermelhidão e hiperemia, sem inchação. A dôr continua durante horas, sempre igual e intensa, sem aumentar nem diminuir. Depois de 24 horas cede a dôr local, estabelecendo-se o começo de uma necrose superficial. Esta necrose é muito persistente, ainda que não aumente de intensidade, sómente depois de 3 semanas a necrose é completamente adsorvida, restando assim ligeira cicatriz, que desaparece sómente depois de 2 meses. Ação geral não pudemos atribuir ao veneno de *Otostigmus scabricauda*.

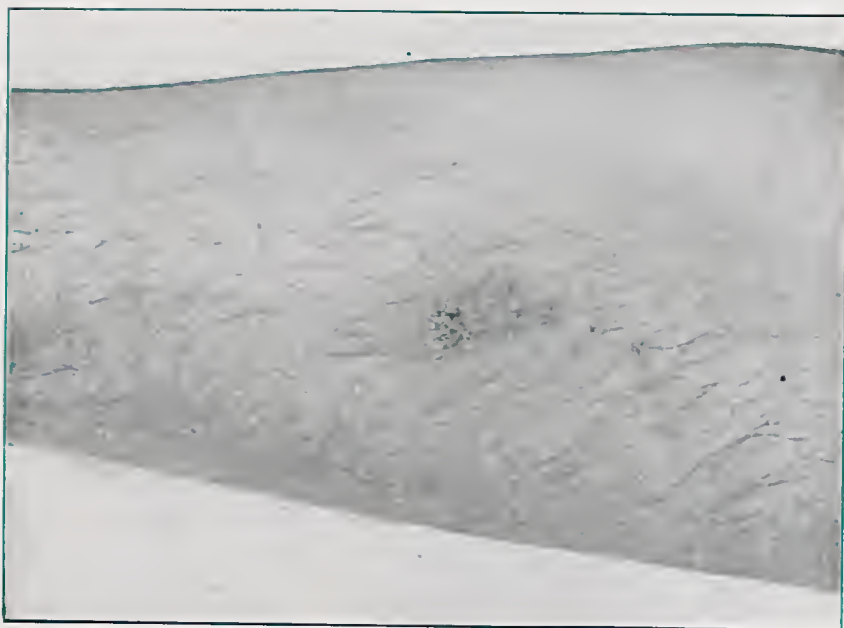



Foto 7
Antebraço humano, mostrando uma ferida superficial, causada por uma mordida de *Otostigmus scabricauda* — 3 dias depois da mordida.

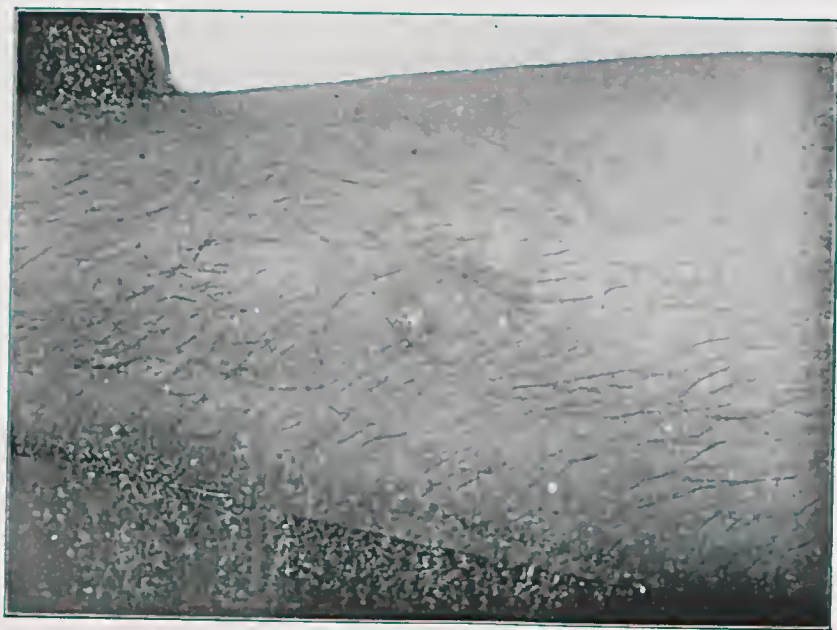



Foto 8
O mesmo antebraço da Foto 7 — 2 semanas depois da mordida.

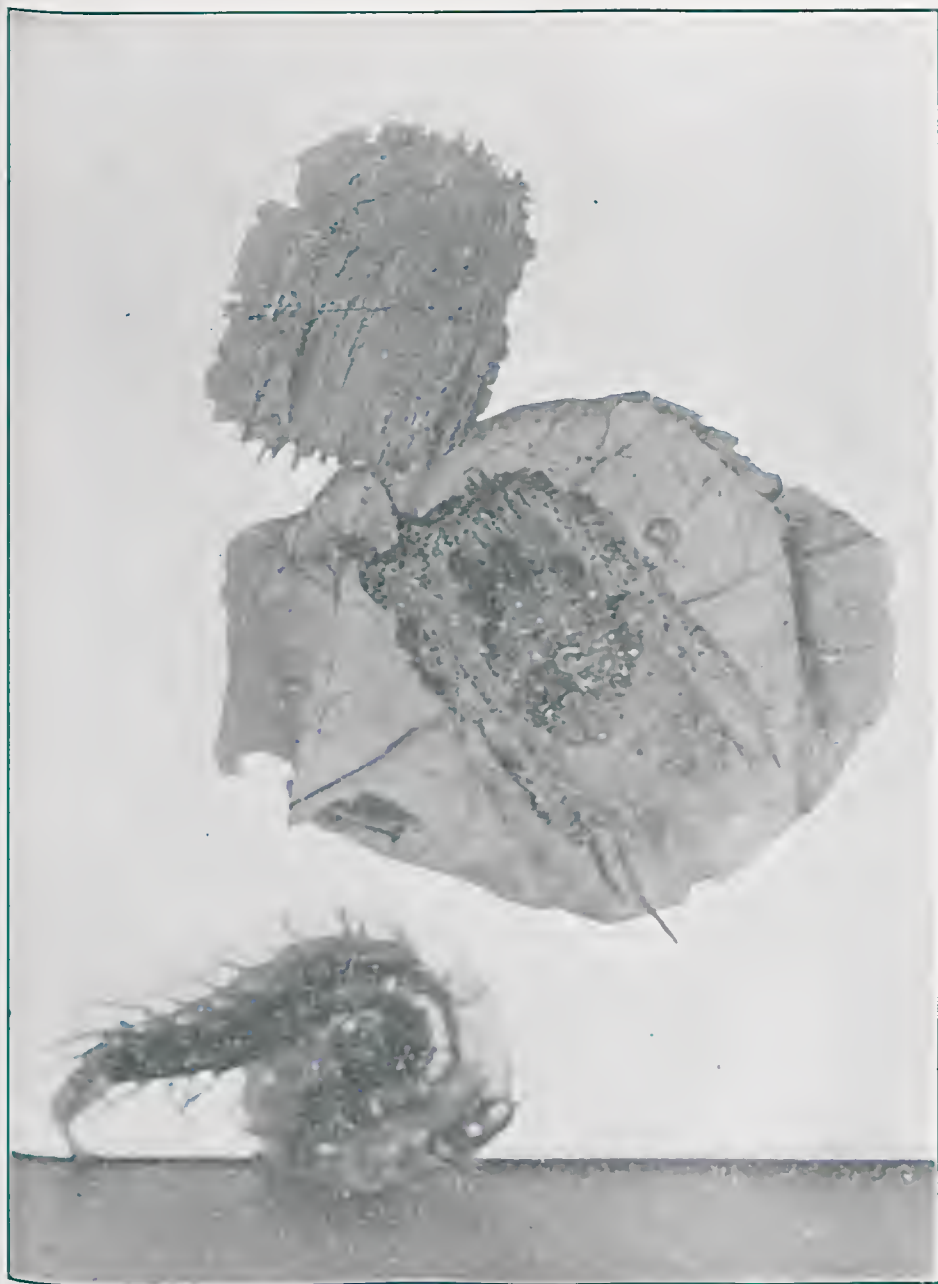



Foto 9
Otostigmus scabricauda — fêmea com ovos.

Cryptops (Trigonocryptops) iheringi

10 glândulas suspensas e emulsionadas em 20 cm³ de solução salina forneceram os seguintes resultados:

1 cm³	veia	4 camundongos	todos mortos dentro de 3 minutos
0,75 cm³	veia	4 camundongos	todos mortos dentro de 14 minutos
0,50 cm³	veia	4 camundongos	todos mortos dentro de 2 horas
0,25 cm³	veia	4 camundongos	1 morto dentro de 18 horas, os outros muito intoxicados, mas melhorando depois de 24 horas
1 cm³	subcutânea	4 camundongos	todos mortos dentro de 11 horas
0,75 cm³	subcutânea	4 camundongos	3 mortos dentro de 24 horas e 1 vivo
0,50 cm³	subcutânea	4 camundongos	todos muito intoxicados, mas sobrevivendo
1 cm³	subcutânea	3 cobáios	levemente intoxicados, mas sobrevivendo
1,50 cm³	subcutânea	3 cobáios	intoxicados, mas sobrevivendo
2,00 cm³	subcutânea	3 cobáios	intoxicados, mas sobrevivendo
2,50 cm³	subcutânea	3 cobáios	intoxicados, mas sobrevivendo
3,00 cm³	subcutânea	3 cobáios	intoxicados, mas sobrevivendo

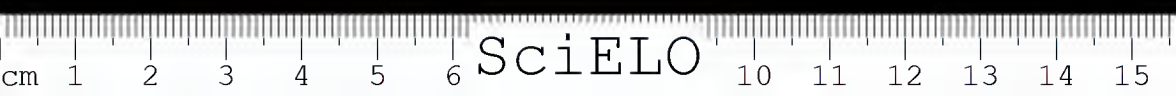
Otocryptops ferrugineus

10 glândulas em 20 cm³ de solução salina

1 cm³	veia	4 camundongos	todos mortos dentro de 4 minutos
0,75 cm³	veia	4 camundongos	todos mortos dentro de 23 minutos
0,50 cm³	veia	4 camundongos	todos mortos dentro de 24 horas
0,25 cm³	veia	4 camundongos	intoxicados, mas todos sobreviventes
2,00 cm³	veia	3 pombos	levemente intoxicados, mas completamente restabelecidos ao cabo de 3 horas
2,00 cm³	subcutânea	4 cobáios	não demonstraram nem sintoma de intoxicação
1,50 cm³	subcutânea	4 camundongos	todos mortos dentro de 24 horas
2,00 cm³	subcutânea	4 camundongos	todos mortos dentro de 24 horas
1,00 cm³	subcutânea	4 camundongos	3 mortos dentro de 24 horas e 1 sobrevivente
0,50 cm³	subcutânea	4 camundongos	todos sobrevivendo

DISCUSSÃO

Embora o método da colheita de glândulas, sua dessecação, trituração e seu emulsionamento em salina, numa diluição determinada, não permite colher resultados muito rigorosos, de um lado porque não se tem a garantia da obtenção de glândulas cheias ou vazias e do outro lado, porque póde ser possível que não haja completa solubilidade das substâncias tóxicas pelo método acima empregado, é-nos, contudo, lícito inferir com bastante clareza sôbre os valores, pelo menos muito aproximativos, da toxidez dos venenos dos escolopendrídios acima referidos. Isto é tanto mais importante no tocante a *possíveis acidentes* tanto para o homem como para os animais, quanto já acima temos esclarecido que as 5 espécies vêm a constituir os *únicos responsáveis escolopendromorfos* que causar possam tais acidentes, pois todas as outras espécies, cujo número não é tão pe-

queno aqui no Brasil, *devem-a priori-ser excluidos da lista dos animais praticamente intoxicantes*: —

1º por serem muito raros.

2º por serem de tamanho tão exíguo que não podem ferir a epiderme humana.

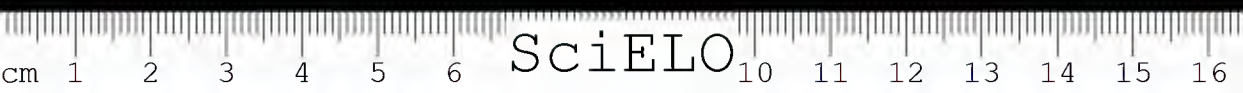
Das 5 espécies, acima referidas, bastante freqüentes em quase todos os territórios do Brasil, podem-se igualmente excluir de antemão como tóxicos e vulnerantes tanto o *Otostigmus scabricauda* como o *Cryptops iheringi* e o *Otocryptops ferrugineus*, os dois últimos principalmente porque vivem sempre em esconderijos, dada a sua ausencia de olhos, e o primeiro porque de maneira alguma consegue perfurar a pele dos animais pilosos (gado doméstico). *Acidentes humanos* estariam no limite do possível, embora não nos conste que tenham ocorrido jamais; mas também nêste caso, mesmo que fosse mordida, por exemplo, uma criança da mais tenra indade, *jamais se verificariam acidentes graves, com prejuizo para a saúde ou para a vida* do vitimado, exceto uma *dôr viva, intensa e persistente durante horas* com ligeira hiperemia, vermelhidão e leve inchação nas primeiras 24 horas; depois edema duro e, mais tarde, ligeira necrose superficial no local da mordida, necrose esta que tende a desaparecer por si mesma depois de algumas semanas.

Portanto, nêstes casos, o remédio consistiria ùnicamente num leve antisético local (diluição de amoníaco ou iodo, etc..) e num analgésico.

Mordidas por *Scolopendra viridicornis* e *subspinipes* são bem possíveis, ainda que raras em animais domésticos, por causa da proteção dos pêlos. *Os acidentes humanos nunca se revestem de seriedade*, podendo, naturalmente, haver casos de extrema sensibilidade, em que ocorrem sintomas de intoxicação geral, como febre, calafrios, inflamação dos gânglios da região da mordida, leve aceleração do rítmo cardiaco. Na maioria dos casos, porém, se verifica dôr intensa, viva e prolongada por 24 horas, mais ou menos, edema e necrose superficial, que tende a desaparecer completamente após algumas semanas.

A *Scolopendra viridicornis*, além de ser a mais agressiva e a maior em tamanho, é também a mais venenosa dentre os escolopendrídios brasileiros e quiçá sulamericanos, sendo a *dóse letal média venosa* por 20 g de camundongo de aproximadamente *trinta milésimos da* glândula e *dóse letal média intramuscular* por 20 g de camundongo *25 centésimos de glândula*. Nêstes casos a morte é produzida por uma ação *neuro-tóxica* do veneno que determina *paralisia respiratória e tetanismo* imediato "post-mortem".

Os pombos são relativamente mais sensiveis ainda.

O veneno de *Scolopendra subspinipes* apresenta uma D. L. M. venosa para 20 g de camundongo de 5 centésimos de glândula e uma de D. L. M. subcutânea para 20 g de camundongo de 7 décimos de glândula.

O veneno de *Otostigmus scabricauda* é ainda mais ativo do que mesmo o de *Scolopendra viridicornis*, constituindo a dose de 12 e meio milésimos de glân-dula a D. L. M. venosa para 20 g de camundongo, enquanto que a D. L. M. sub-cutânea para 20 g de camundongo é de 37 centésimos de glândula.

Os princípios tóxicos de *Cryptops iheringi* e *Otocryptops ferrugineus* são bem menos ativos sôbre animais de laboratório.

CONCLUSÕES

Pelo presente trabalho são fornecidos dados relativos à ação dos venenos dos *escolopendromorfos* mais frequentes e de maior tamanho no Brasil, a sa-ber: —

Scolopendra viridicornis

Scolopendra subspinipes

Otostigmus scabricauda

Cryptops iheringi

Otocryptops ferrugineus

Igualmente é feito um estudo morfo-histológico do aparelho inoculador e da glândula venenífera.

O veneno das 5 espécies referidas foi dosado em camundongos, cobaios e pombos, tanto por via venosa, subcutânea como intramuscular, estabelecendo-se as *doses letais médias*. Foram também feitas observações sôbre a *ação local do ve-neno*, que se traduz apenas numa hiperemia ligeira, com pouca tumefacção; dor intensa, forte, a perdurar muitas horas; um espessamento nodular subcutâneo com necrose superficial que, depois de algumas semanas, desaparece sem deixar ci-catriz.

Em vista dos resultados, auferidos pelas dosagens dos venenos, podemos con-cluir que mesmo os maiores escolopendrícos do Brasil, como a *Scolopendra viri-dicornis* e *subspinipes*, são absoluatmente *incapazes de, pela sua mordida, afetar sèriamente a vida humana*, mesmo a de crianças de pouca idade.

ABSTRACT

The venom of the 5 frequentest and greatest Brazilian species of *Chilopoda* (*Scolopendrmorpha*), *Scolopendra viridicornis*, *S. subspinipes*, *Otostigmus sca-bricauda*, *Cryptops iheringi* and *Otocryptops ferrugineus*, is studied. A morpho-hystological study of the poisonous apparatus and the poisonous gland of *Scolo-pendra viridicornis* is also given.

The venoms "*dosis lethalis media*" of the 5 species in laboratory animals (mouses, Guinea-pigs and pigeons) is demonstrated as wel as the local action of the venoms of the 5 *Scolopendromorpha* is observed to consist only in a great and intensive pain (like fire), redness of the local-bite and little superficial "necrosis", which is absorved after 1 or 3 weeks without cicatrize.

The animal-experiments are considerated to be sufficient to prove that the venom of the greatest Brazilian species (*Scolopendra viridicornis* and *S. subspinipes*) of *Scolopendromorpha*, injected by a occasionally bite, *is too feeble to cause a serious intoxication or other danger for life* in man or children of little age.

Agradecemos as fotografias ao sr. Seixas, fotógrafo do Instituto Butantan.

BIBLIOGRAFIA

1. *Faust, E. St.* Vergiftungen durch tierische Gifte *in Flury, F. & Zangger, G.*, Lehrbuch der Toxikologie, Berlin, 1928.
2. *Pawlowsky, E. N.* Giftiere und ihre Giftigheit, Jena, 1927.
3. *Pawlowsky, E. N. & Stein, A. K.* The action of Scolopendra venom upon human skin, *Med. Parasit. a. parasiticdis, Moscou*, 4(1-2):88-90, 1935.
4. *Venzmer, G.* Giftige Tiere und tierische Gifte, 1932.
5. *Barthmeyer, A. & Sckmalfuss, H.* Sammlung von Vergiftungsfaellen, 4(9):14, 1933.
6. *Porter, C.* Introducción al estudio de los miriapodos, Santiago (Chile), *Impr. Univ.*, 1941.
7. *Machado, O.* Observações sobre as mordeduras das escolopendras, *Bol. Inst. Vital Brasil*, 27:5-7, 1944.

Mem. Inst. Butantan,
19:199-210, 1946.

SÔBRE A ANEMIA DOS CÃES PELO BENZOATO DE ESTRADIOL

POR J. R. VALLE & J. LEAL PRADO

(Do Laboratório de Endocrinologia do Instituto Butantan, São Paulo, Brasil)

A anemia produzida em cães com altas doses de substâncias estrogênicas naturais ou artificiais foi minuciosamente descrita por Castrodale. Bierbaum, Helwig e Mac Bryde (1). Tyslowitz e Dingemanse (16) e, entre nós, Cruz, Mello e Silva (2). As doses de benzoato de estradiol empregadas pelos autores citados e o rítmo de tratamento foram de tal natureza que os animais sucumbiram de anemia aguda com enterorragias, trombocito e granulocitopenia dentro de periodo relativamente curto. Entretanto, na dose diária de 1 mg de benzoato de estradiol ou de estilbestrol, durante 9 meses, segundo Tyslowitz e Dingemanse (16), os cães se mantinham em boas condições.

No decurso de experiências sôbre o comportamento à micção conforme o estado hormonal, tivemos a oportunidade de examinar o sangue de 25 cães observados no biênio de 1943-44. Tratando-se de animais injetados desde a infância com doses pequenas de benzoato de estradiol, seria interessante procurar si nestas condições o hormônio exerceria ainda a sua ação anemiante. De fato, somente nos animais tratados com o estrogeno se desenvolveu uma leve anemia do tipo normocitico e normocrônico, não acompanhada de enterorragias ou de notória destruição hemática intra-orgânica.

Neste trabalho focalizamos o assunto no que respeita à dose e ao tempo de tratamento, mostramos a presença no sangue dos anêmicos de uma taxa maior de hemoglobina inativa e comentamos alguns pontos que nos pareceram dignos de registro.

MATERIAL E MÉTODOS

Empregamos no presente estudo 15 cães e 10 cadelas pertencentes às raças Fox, de pêlo liso, e "basset" ou mestiços de ambas, criados no nosso laboratório e mantidos nas mesmas condições de alimentação e cativeiro. Os animais ficaram assim distribuidos: 4 machos normais; 5 machos castrados, dos quais 2 tratados com óleo de amendoim; 2 machos castrados e tratados com propionato

Entregue para publicação em 10 de maio de 1946.

de testosterona; 4 machos castrados e tratados com benzoato de estradiol; 2 fêmeas normais; 2 fêmeas castradas, sendo 1 tratada com óleo de amendoim; 4 fêmeas castradas e tratadas com propionato de testosterona; e, finalmente, 2 fêmeas castradas e tratadas com benzoato de estradiol. Os principais dados referentes aos animais em apreço vêm no Quadro I. Os cães eram pesados duas vêzes por mês e injetados subcutaneamente três vêzes por semanas ou com óleo de amendoim (0,5 a 1,0 ml) ou com a substância hormonal dissolvida em veículo oleoso (*). O benzoato de estradiol foi usado na dose média de 0,5 mg três vêzes por semana. Em alguns casos o tratamento androgênico foi feito pelo método das implantações, debaixo da péle dorsal, de pequenos comprimidos do hormónio cristalizado.

Os cães foram observados em duas séries: na primeira, em 1943, as contagens de hemátias e as dosagens de hemoglobina foram feitas mensalmente a partir do 6º mês de tratamento em diante. Na segunda série, em 1944, os exames foram feitos bimensalmente a partir do início do tratamento. Todos os animais foram tratados repetidas vêzes com óleo de quenopódio (**) e os da segunda série receberam ainda, duas vêzes, tetracloreto de carbono (0.1 ml por kg em cápsulas gelatinosas) conforme as indicações de Lamson e colaboradores (9). A pesquisa de ovos de helmintos nas fézes foi sempre feita depois de concentração do material com solução saturada de cloreto de sódio.

a) *Colheita do sangue.* Foi feita da safena externa, sem anestesia, em tubos de vidro oxalatados a 0.2 g%. A estáse venosa era apenas o necessário para a introdução da agulha.

b) *Contagem de eritrocitos.* Usamos o sangue diluido 200 vêzes em Ringer-Locke, colocado nos dois retículos da câmara de Buerker e seguimos, em linhas gerais, o método microfotográfico descrito por Lida e Goldberg (11). Nos nossos exames faziamos a cópia direta em papel Azo No. 2, empregando a luz do arco voltáico e a exposição de 1 minuto. Verificada a distribuição homogênea dos globulos, eram fotografados dois ou três campos e contados depois, com numerador automático, 10 ou 15 pequenos quadrados.

c) *Dosagem de hemoglobina total e inativa.* Nas determinações da série de 1943 foi usado o método colorimétrico de Cohen e Smith, descrito no livro de Hawk e Bergeim (7). Posteriormente foi verificado não ser o processo sa-

---

(*) Agradecemos às Casas Ciba (Perandren), Schering (Progynon e Testoviron) e Organon (Dimenformon e Neohombreol) o material hormonal empregado nestas experiências.

(**) Usamos o vermífugo a base de óleo de quenopódio distribuido pelo Instituto Biológico de São Paulo.

Dados individuais, condições e tratamento dos cães

Grupo	Cão No.	Data do nascimento (*)	Pêso em kg Inicial	Pêso em kg Final	Idade à castração	Tratamento	Observações
Machos normais	1	—	—	7.2	—	—	
	R2	—	—	6.4	—	—	
	39	31.X.42	1.2	6.8	—	—	Sacrificado em 16.II.44
	40	31.X.42	1.0	7.4	—	—	Falecido em 20.X.43
Machos castrados	37	31.X.42	1.2	8.0	52 dias	21 ml óleo amendoim em 64 inj. subcut.	Sacrificado em 4.I.44
	57	5.XII.42	1.0	5.0	38 dias	17 ml óleo amendoim em 34 inj. subcut.	Sacrificado em 28.XII.44
	2	14.XI.43	3.3	8.6	112 dias	—	Sacrificado em 17.I.45
	13	2.I.44	2.4	6.5	61 dias	—	Sacrificado em 28.XI.44
	14	2.I.44	2.2	6.3	61 dias	—	Sacrificado em 17.XI.44
Machos castrados e tratados com prop. de testosterona	12	2.I.44	2.2	6.6	60 dias	81 mg em 6 impl. do horm. cristalino	Sacrificado em 28.XI.44
	18	6.XI.43	4.2	10.1	118 dias	141 mg em 6 impl. e 6 inj. subcut.	Sacrificado em 28.XI.44
Machos castrados e tratados com benzoato de estradiol	36	31.X.42	2.5	8.3	52 dias	27 mg do horm. em 67 inj. subcut.	Sacrificado em 4.I.44
	38	31.X.42	2.7	9.0	52 dias	32 mg do horm. em 63 inj. subcut.	Sacrificado em 16.II.44
	4	16.XI.43	4.5	5.4	107 dias	32 mg do horm. em 60 inj. subcut.	Sacrificado em 17.XI.44
	5	16.XI.43	3.9	6.4	107 dias	32 mg do horm. em 60 inj. subcut.	Sacrificado em 21.XI.44
Femeas normais	43	—	—	8.6	—	—	
	R4	15.V.40	—	9.0	—	—	
Femeas castradas	58	5.XII.42	1.3	6.5	39 dias	—	Sacrificada em 29.II.44
	63	15.XII.42	1.0	7.6	43 dias	16 ml óleo amendoim em 31 inj. subcut.	Sacrificada em 4.II.44
Femeas castradas e tratadas com prop. de testosterona	60	15.XII.42	1.2	7.0	43 dias	345 mg do horm. em 66 inj. subcut.	Sacrificada em 14.III.44
	62	15.XII.42	1.2	7.5	43 dias	345 mg do horm. em 66 inj. subcut.	Sacrificada em 4.IV.44
	7	16.XI.43	2.1	4.0	111 dias	160 mg em 6 impl. e 7 inj. subcut.	Sacrificada em 14.XII.44
	15	2.I.41	2.1	5.0	64 dias	181 mg em 6 impl. e 8 inj. subcut.	Sacrificada em 1.II.45
Femeas castradas e tratadas com benzoato de estradiol	6	16.XI.43	2.6	3.6	111 dias	4 mg do horm. em 8 inj. subcut.	Falecida em 26.V.44
	21	6.XI.43	3.6	7.8	118 dias	35 mg do horm. em 59 inj. subcut.	Sacrificada em 23.XI.44

(*) Os animais 4, 5, 6 e 7; 12, 13, 14 e 15; 18 e 21; 36, 37, 38, 39 e 40; 57 e 58; 60, 62 e 63, de mesma data de nascimento, pertencem à mesma ninhada.

tisfatório para as determinações precisas de hemoglobina em sangue de cão, e já na série de 1944 foi usado o método de Ponder (14) com ligeira modificação. As determinações de hemoglobina inativa foram feitas pelo método descrito em trabalho anterior de um de nós (13).

d) *Contagem de reticulocitos.* Seguimos o método descrito em Whitby e Britton (18).

e) *Pesquisa de sangue nas fêzes.* Depois de manter o cão durante 3 dias em dieta livre de carne fazia-se a pesquisa conforme recomendam Kolmer e Boerner (8). A especificidade do método é muito boa e a sua sensibilidade de 1:10 mil com material fresco (5).

f) *Dosagem de bilirubina no plasma.* Foi empregado o processo de Haslewood e King (6).

g) *Determinação do volume corpuscular.* Foi seguido o mesmo processo descrito em trabalho anterior (17).

RESULTADOS

Em ambas as séries estudadas o efeito anemiante do benzoato de estradiol ficou bem evidente conforme se pode vêr pelos resultados médios mensais da contagem de hemátias e da dosagem de hemoglobina (Figs. 1-4). A simples cas-

Fig. 1

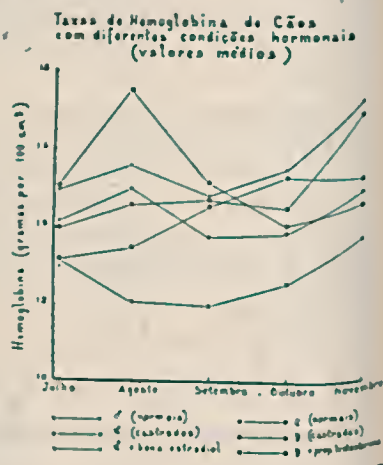



Fig. 2

tração ou o tratamento pelo propionato de testosterona ou pelo veículo oleoso em ambos os sexos, não interferiram nos valores hematológicos. Constituiram assim êstes diferentes grupos experimentais, as melhores testemunhas da influência anemiante do estradiol.

QUADRO II

Valores hematológicos médios nas 2 séries de cães

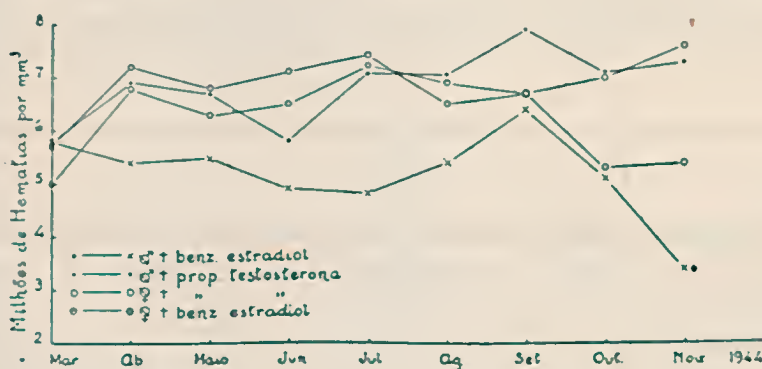
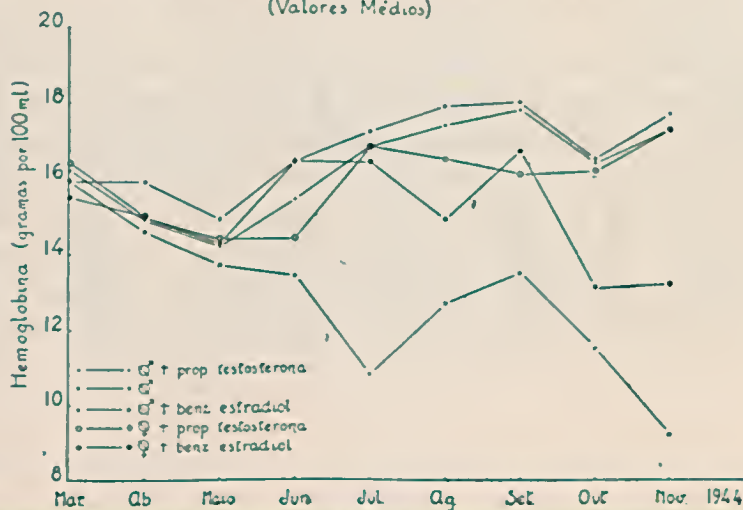
Séries	Número de cães	Eritrocitos (10^6/mm³)			Hemoglobina (g%)		
		Testemunhas	Anêmicos	Indice sign.[2]	Testemunhas	Anêmicos	Indice sign.
1943	14	5.82 ± 0.48[1]	5.30 ± 0.28	2.7	14.82 ± 1.22	12.70 ± 1.07	4.0
1944	11	7.13 ± 0.73	5.24 ± 0.88	9.5	16.93 ± 1.30	12.51 ± 1.03	15.8

[1] Sigma da distribuição

[2] Indice de significância calculado segundo a fórmula $m\text{-}m'/\sqrt{e^2 + e'^2}$

Os valores hematológicos médios para as testemunhas nas duas séries estudadas foram mais baixos em 1943 (vêr Quadro II); mas ainda assim a diferença em relação ao grupo de injetados com estradiol foi significativa.

FIG. 3

QUADRO III

Dados hematológicos médios dos cães estudados na 2.ª série (1944)

Grupos	Hemoglobina	Março	Abril	Maio	Junho	Julho	Agosto	Setembro	Outubro	Novembro
3 machos castrados	Eritrocitos (10^6/mm³)	—	—	—	—	—	7.8	7.1	7.1	7.0
	Hemoglobina (g%)	15.9	15.9	14.9	16.4	17.2	17.9	18.0	16.5	17.5
	Hematocrito (%)	—	—	—	—	—	50	51	50	56
	Hemogl. corp. média (γγ)	—	—	—	—	—	23	29	23	27
	Volume corp. médio (μ³)	—	—	—	—	—	64	84	67	86
	Conc. média Hb. corp. (%)	—	—	—	—	—	36	34	34	31
	Reticulocitos (%)	—	—	—	—	0.1	—	0.9	0.5	0.5
2 machos castrados + Prop. testosterona	Eritr.	5.8	6.9	6.7	5.8	7.1	7.1	7.9	7.1	7.3
	Hb.	16.2	11.9	14.2	15.4	16.8	17.4	17.8	16.1	17.3
	Hemat.	—	—	—	—	54	50	52	50	53
	H. C. M.	28	21	21	26	24	21	23	23	24
	V. C. M.	—	—	—	—	77	70	65	70	72
	C. M. Hb. C.	—	—	—	—	31	34	34	33	32
	Reticulocitos	—	—	—	—	—	—	—	0.4	0.2
2 machos castrados + Benz. estradiol	Eritr.	5.8	5.4	5.5	4.9	4.8	5.4	6.4	5.1	3.4
	Hb.	15.5	11.6	13.7	13.4	10.8	12.7	13.5	11.5	9.2
	Hemat.	—	—	—	—	36	42	42	35	29
	H. C. M.	27	27	25	27	22	21	22	22	25
	V. C. M.	—	—	—	—	75	78	66	68	77
	C. M. Hb. C.	—	—	—	—	30	30	32	33	33
	Reticulocitos	—	—	—	—	3	1.2	0.8	2.8	1.1
2 femeas castradas + Prop. testosterona	Eritr.	5.0	6.8	6.3	6.5	7.2	6.9	6.7	7.0	7.6
	Hb.	16.4	15.0	14.4	16.4	16.8	16.5	16.1	16.2	17.3
	Hemat.	—	—	—	—	52	50	45	50	53
	H. C. M.	30	22	23	25	23	24	24	23	23
	V. C. M.	—	—	—	—	72	73	68	71	70
	C. M. Hb. C.	—	—	—	—	32	33	35	32	32
	Reticulocitos	—	—	—	—	0.3	0.5	1.1	0.1	—
[illegible]	Eritr.	5.7	7.2	6.8	7.1	7.4	6.5	6.7	5.3	5.4
	Hb.	15.5	15.0	14.3	14.4	16.4	14.9	16.7	13.1	13.1
	Hemat.	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]

O exame repetido de fézes (pesquisa de sangue e dos ovos) e a autopsia de 3 dos cães anêmicos afastaram a possibilidade da anemia depender de enterorragias ou da presença de helmintos em grande quantidade na luz intestinal. Entretanto a anemia mais intensa do cão No. 4 pode ser explicada, em parte, pela presença no intestino de grande número de ancilóstomos coincidente com a positividade de sangue nas fézes. O teor de bilirubina do plasma dos cães anemiados não diferiu do encontrado nos animais testemunhas (0.2 a 0.5 mg%). Pelo volume da hemátia e pela concentração média de hemoglobina corpuscular (Quadro III) a anemia observada foi do tipo normocítico e normocrômico. A julgar pela ausência de resposta reticulocitária e pelos exames hematológicos subseqüentes, os cães anemiados não responderam ao tratamento pelo ferro e pelo extrato hepático. Embora as contagens de glóbulos brancos tenham sido em pequeno número e não sistematizadas, não foi observada granulocitopenia aos exames feitos.

Interessante assinalar que a anemia pelo estradiol foi acompanhada de uma elevação no teor de hemoglobina inativa (não combinável ao oxigênio) do sangue. No grupo de animais anêmicos a média de hemoglobina inativa em 5 amostras de sangue foi de 21.2%, praticamente duas vêzes o valor médio encontrado para os cães normais, (10.9%).

DISCUSSÃO

A hematologia normal do cão adulto já foi estudada entre outros por Wintrobe (19) Landsberg (10) e, recentemente, no Brasil, por Cruz, Silva e Melo (3). As diferenças de autor para autor nos levaram à conclusão de que, no nosso caso, o melhor critério seria comparar os valores encontrados no grupo de injetados com o estradiol com os obtidos nos cães dos demais grupos, todos vivendo nas mesmas condições e estudados com métodos idênticos. Mesmo procedendo assim foi observada uma diferença significativa entre a hematologia "*normal*" da série de 1943 e a da série de 1944. Enquanto que em 1943 os valores médios e desvios padrões foram 5.82 ± 0.48 milhões de eritrocitos por mm3 e 14.82 ± 1.22 gramas de hemoglobina por cento, na série de 1944 encontramos 7.13 ± 0.73 milhões de hemátias e 16.93 ± 1.30 gramas de hemoglobina. Esta diferença poderia depender da alimentação ou ser devida à infestação helmíntica dos animais da série de 1943. Si bem que os cães desta primeira série tenham recebido óleo de quenopódio não podemos afastar a helmintiase intestinal. Na maioria dos casos isto não ocorreu em 1944 pois os animais desta série receberam também tetracloreto de carbono, tratamento mais

eficaz no dizer de Lamson e colaboradores (9). Além disso os cães desta segunda série foram autopsiados e examinada a luz intestinal. Portanto, apesar de pequeno o número de animais os resultados de 1944 podem ser tomados como valores comparativos adequados dada a repetição bimensal dos exames durante 5 meses.

Já está bem assentado que o número de eritrocitos e a taxa de hemoglobina são menores nos cães infantis do que nos adultos (10). Com efeito, na nossa segunda série de cães, os valores hematológicos médios foram mais baixos nos 4 primeiros do que nos 5 últimos meses da experimentação. Para evitar, então, que os valores mais baixos, devido à idade, influenciassem nas médias normais do cão adulto, só computamos para este efeito as determinações feitas nos últimos 5 meses.

Os valores hematológicos médios normais para os cães do Rio de Janeiro, segundo Cruz, Silva e Mello (3), baseado em 135 casos, foram de 5.70 ± 0.67 milhões de eritrocitos por mm3 e 12.60 ± 1.26 gramas de hemoglobina por cento. Êstes valores se aproximam dos encontrados no presente trabalho para os cães anémicos. Mesmo levando em consideração as altitudes de São Paulo e Rio (700 e 760 mm de Hg) ainda é difícil explicar a diferença entre os nossos e aquêles valores hematológicos. Segundo Fitzgerald (4) para cada 100 mm de Hg de quéda da pressão barométrica haveria somente um aumento de 10% na hemoglobina sanguínea. Portanto, apesar do trabalho dos autores brasileiros citados, consideramos uma taxa de 12.50 a 12.70 g de Hb% como indice de uma anemia do cão em São Paulo.

Na série de 1943 a anemia dos cães tratados com estradiol ficou manifesta em torno do 7°. mês de tratamento, mas na série de 1944 ela já poude ser notada no fim de 3 meses de iniciadas as injeções. Talvez a anemia verminótica discreta nos cães da primeira série, já no inicio do tratamento, tenha encoberto a fase inicial da anemia pelas pequenas doses do estrogeno.

A determinação dos indices de Wintrobe nos cães da segunda série e a partir do 5°. mês, mostra que o volume médio da hemátia e a quantidade média de hemoglobina corpuscular não sofreram alteração significativa. Êstes valores permitem classificar a anemia como normocítica e normocrônica o que vem corroborar a conclusão de Cruz *et alt.* (2) sôbre o tipo de anemia produzida por doses maiores do hormônio. Nesse trabalho os autores citados discutem bem o mecanismo da anemia pelos estrogenos e mostram que as hemorragias intestinais constituem fator etiológico de grande importância. Na anemia produzida por pequenas doses de estradiol, no entanto, as hemorragias intestinais não foram obser-

vadas. Diante do exposto e como não registramos também notoria destruição hemática intra-orgânica, acreditamos que a anemia dos nossos cães tenha sido a conseqüência de uma ação direta do hormônio sôbre a medula óssea. É bem conhecido o fato de que os estrogenos aumentam a trabeculização epifisária (12) e isto pudemos observar também nos nossos cães(*). É bem possível que êste fenômeno se relacione com a redução da capacidade hematopoiética medular.

Os nossos resultados em relação às doses utilizadas estão em desacôrdo com os dados de Tyslowitz e Dingemanse (16). Êstes autores, conforme já foi dito, não obtiveram ação aneміante do estradiol na dose diária de 1 mg durante 9 meses e no entanto registramos efeito positivo com a dose de 0.5 mg três vêzes por semana, durante 8 a 10 meses. Os mesmos autores falam na maior sensibilidade ao tratamento estrogênico de cães jovens, de mesma linhagem; é bem possível, pois, que tenham sido êstes os principais fatores da resposta dos nossos cães à ação anemiante do estradiol.

Não foi ainda registrado, ao que parece, o fato do tratamento estrogênico aumentar o teor da hemoglobina inativa do sangue de cães. Até que ponto e de que forma estradiol exerce esta ação é questão para ser elucidada. O teor de hemoglobina inativa no sangue do cão constituiu objeto de trabalho a parte escrito por um de nós (13).

CONCLUSÕES

1ª. O tratamento de cães desde a infancia com benzoato de estradiol na dose média de 0.5 mg em injeções subcutâneas três vêzes por semana, durante 8 a 10 meses, conduz a uma anemia benigna normocítica e normocrômica não acompanhada de enterorragias ou de destruição hemática intra-orgânica.

2ª. A anemia observada se acompanha de uma elevação na taxa de hemoglobina inativa (não combinável ao oxigênio) do sangue.

3ª. A anemia benigna dos cães pelo estradiol, em pequenas dóses e tempo longo, parece depender exclusivamente de ação diréta do hormônio sôbre a medula óssea.

4ª. A castração simples e o tratamento quér pelo propionato de testosterona quér pelo veículo oleoso (óleos de sésamo e de amendoim) não modificaram o quadro hematológico dos cães estudados.

5ª. Reunidos os diferentes grupos de série de 1944, exclusive os tratados com estradiol, foram considerados como normais em São Paulo os seguintes

(*) Dados ainda não publicados.

valores hematológicos para o cão: 7.13 ± 073 milhões de eritrocitos por mm^3; 16.93 ± 1.30 gramas de hemoglobina por cento e 47.4 ± 2.74 por cento para o volume globular.

ABSTRACT

Castrated puppies injected with estradiol benzoate, 0.5 mg three times a week within a year, exhibited from the 3rd to the 7th month a benign anemia as far as the maintenance of life is concerned. Erythrocytes dropped from 7.13 ± 0.73 to 5.24 ± 0.84 millions per mm^3 and hemoglobin from 16.93 ± 1.30 to 12.51 ± 1.08 g per 100 cm3.

The blood content of non-oxygen-combining form of hemoglobin (inactive hemoglobin) increased in the anemic group from 10.9 to 21.2%.

Dogs with this benign normochromic and normocytic anemia, induced by little doses of estradiol, showed neither enterorrhagia nor intraorganic blood destruction. It seems that the hormone inhibits the activity of the medullary hematogenic tissue.

Castration and treatment by testosterone propionate do not affect the blood picture of the animals employed as controls.

BIBLIOGRAFIA

1. *Castrodale, D.; Bierbaum, O.; Helwig, E. B. & Macbryde, C. M.* Comparative studies of the effects of estradiol and stilboestrol upon the blood, liver and bone marrow. *Endocrinology*, **29**:363-372. 1941.
2. *Cruz, W. O.; Mello, R. P. & Silva, E. M.* Estudos sôbre a anemia produzida em cães por benzoato de estradiol. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **41**:167-177, 1944.
3. *Cruz, W. O.; Silva, E. M. & Mello, R. P.* Dados hematológicos do cão adulto normal. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **42**:609-628, 1945.
4. *Fitzgerald, M. P.* Citado por *Sankaran & Rajagopal* (15).
5. *Gettler, A. O. & Kaye, S.* The phenolphtalein test for the detection of "occult" blood. *Amer. J. Clin. Path. Tech. Sect.*, **7**:77-79, 1943 (in *Chem. Abst.*, **3**:36, 1944).
6. *Haslewood, G. A. D. & King, E. J.* The estimation of bilirubin in blood plasma. *Biochem. J.*, **31**:920-923, 1937.
7. *Hawk, P. B. & Bergeim, O.* Practical physiological chemistry, ed. 11, 968 pp., figs. Philadelphia, Blakiston Co., 1943.
8. *Kolmer, J. A. & Boerner, F.* Approved Laboratory Technic, ed. 2, 244 pp., New York, Appleton, 1938.
9. *Lamson, P. D.* e outros. The pharmacology and toxicology of carbon tetrachloride. *J. Pharmacol. & Exper. Therap.*, **22**:215-288, 1924.

10. *Landsberg, J. W.* The blood picture of mature normal dogs, *Anat. Record,* **84**:415-421, 1942.

11. *Lido, E. & Goldberg, I.* Recuentos de eritrocitos por la fotomicrografia, *Rev. Soc. argent. de biol.,* **16**:523-527, 1940.

12. *McLeon, F. C.* Physiology of bone, *Ann. Rev. Physiol.,* **5**:79-105, 1943.

13. *Prado, J. L.* Hemoglobina inativa (não combinável ao oxigênio) no sangue do cão e do homem, *Mem. Inst. Butantan,* **19**:22-30, 1946.

14. *Ponder, E.* The relation between red blood cell density and corpuscular hemoglobin concentration, *J. Biol. Chem.,* **144**:333-338, 1942.

15. *Sankaran, G. & Rajagopal, K.* The effect of altitude on haemoglobin content, *Ind. J. M. Research,* **29**:971-977, 1938.

16. *Tyslowitz, R. & Dingemanse, E.* Effect of large doses of estrogens on the blood picture of dogs, *Endocrinology,* **29**:817-828, 1941.

17. *Valle, J. R. & Prado, J. L.* Nota sôbre a hematologia dos ofídios. Índices de Wintrobe da *Bothrops jararaca, Mem. Inst. Butantan,* **18**:241-246, 1945.

18. *Whitby, L. E. H. & Britton, C. J. C.* Disorders of the blood, ed. 4, 595 pp., 59 figs., Philadelphia, Blakiston, 1942.

19. *Wintrobe, M. M.* e outros. Values for number, size and hemoglobin content of erythrocytes in normal dogs, rabbits and rats, *Amer. J. Physiol.,* **114**:502-507, 1936.

ESTUDOS SOBRE AS SALMONELOSES EM SÃO PAULO

I. *Incidência dos diferentes tipos em diarréias infantis*

POR C. A. PELUFFO (*); O. BIER; J. P. AMARAL & E. BIOCCA

(Do Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan, São Paulo, Brasil)

O aperfeiçoamento das técnicas de isolamento trouxe como consequencia a verificação de uma maior incidência das salmonelas como causa de distúrbios gastro-intestinais, particularmente em crianças (1,2). A identificação sorológica dos vários tipos de salmonela que ocorrem em uma dada localidade apresenta evidentemente grande interêsse epidemiológico e talvez mesmo interêsse terapêutico, pois diferentes tipos de microorganismos poderão apresentar uma sensibilidade seletiva a este ou aquele medicamento. Tais investigações requerem, porém, organização adequada, especialmente o estudo da composição antigênica, que exige o preparo de grande número de soros absorvidos, rigorosamente especificos para os diferentes antigenos de salmonelas. No Brasil, um tal centro de pesquisas não havia sido ainda organizado, sendo necessario recorrer a laboratórios especializados no estrangeiro, a fim de estabelecer a identificação sorológica dos tipos aqui encontrados (3). Com o objetivo de preencher esta lacuna, organizou-se, em principios de 1945, no Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan, um serviço especializado para o estudo das salmonelas. Os trabalhos iniciais de organização técnica, durante os primeiros dois meses, estiveram a cargo de C. A. Peluffo, cuja experiência no assunto permitiu rapidamente o estabelecimento das técnicas fundamentais de isolamento, bem como do preparo dos soros diagnosticos. Desta maneira, o estudo da sorologia das salmonelas, a principio realizado com uma coleção de soros provenientes do Laboratório de Montevidéu, se processa hoje com soros já obtidos no Instituto Butantan pela imunização de coelhos com amostras-tipo, após absorção adequada e comprovação rigorosa da especificidade, serviço agora de ordem rotineira neste Laboratório.

O presente trabalho resume os resultados obtidos em 459 exames de fezes, sendo 426 de crianças e 33 de adultos, dos quais foram isolados 58 salmodelas filiadas a 16 diferentes tipos, 18 shigelas e paracoli com antigenos de salmonelas.

(*) Do Instituto de Higiene de Montevidéo, Lab. de Bacteriologia (Dir.: Prof. E. Hormaeche), subvencionado por uma bolsa dos Fundos Universitários de Pesquisa para a Defesa Nacional.

Recebido para publicação em 31 de agosto de 1946.

MATERIAL E MÈTODOS

O material para as observações referidas foi obtido, em sua maior parte, do Hospital de Indianópolis (Cruz Vermelha Brasileira), bem como também do Centro de Saúde de Santa Cecilia, do Ambulatório da União Civica Feminina e do Serviço de Clinica Pediatrica da Escola Paulista de Medicina.

As fezes das crianças, colhidas logo após a emissão (raramente com sonda) e enviadas ao laboratório dentro de um espaço de 2 horas, eram imediatamente espalhadas em placas com meio de Kristensen (verde brilhante), em meio de Leifson (desoxicolato) (*) e em meio sem inibidor (agar-vermelho de fenol).

Contemporaneamente eram as fezes semeadas em meio de enriquecimento de Kauffmann, do qual se fizeram repiques para Kristensen e para agar-vermelho de fenol após 1 e 5 dias de incubação a 37°.

As colônias suspeitas, em média 10 de cada placa, eram pescadas e passadas para caldo S V (4), a fim de separar os proteos e os colis; as culturas selecionadas em S V eram, então, semeadas numa pequena série de açúcares (lactose, sacarose, manita, glicose), bem como em água peptonada, em presença de papéis reativos para a evidenciação de indol e de H_2S.

As culturas que exibiam propriedades bioquimicas de salmonelas eram, então, cultivadas em agar, preparando-se uma suspensão com a qual se procedia a uma aglutinação em placa de vidro em presença de um soro polivalente. No caso de se ter com este soro uma aglutinação positiva, era a suspensão, a seguir, experimentada com toda a série de soros somáticos e flagelares presentemente disponiveis no laboratório, a saber: *soros somáticos*: I—II—III—IV—V—VI.XIV.XXIV—VII—VIII—IX—X.XXVI—XI—XIII.XXIII.XXXV—XIV.XXV—XV—XVI—XVII—XVIII—XIX—XX—XXI—XXII—XXIII—XXIV—XXV—XXVII — XXVIII — XXIX — XXX — XXXIII — XXXIV — XXXV — XXXVIII — ; *soros flagelares*: a—b—c—d—eh—en—enx—f—fgh—gom—goq—gst—h—i—k—lv—lw—m—nxz 17—p—q—r—s—t—u—v—w—y—z—z^4—z^6—z^{10}—z^{12}—z^{13}—z^{14}—z^{17}—z^{27}—z^{28}—z^{29}—1.5—1.7—2—3—5—6—7—10—13.

Para a pesquisa da 2a. fase flagelar quando esta não se encontrava logo de inicio, era feita cultura na superficie de um tubo de agar semi-sólido adicionado do soro flagelar correspondente à fase já conhecida, recolhendo-se o crescimento bacteriano obtido nas camadas inferiores do meio. Tal artificio, permitia facilmente a obtenção da 2a. fase flagelar indispensavel, em certos casos, á identificação da cultura.

(*) Êste meio foi usado apenas nos 211 primeiros exames.

2

RESULTADOS E COMENTÁRIOS

A grande maioria das amostras de salmonelas isoladas poude ser enquadrada no esquema dos tipos conhecidos. Um tipo novo foi encontrado — *S. butantan*, que será descrito a seguir, bem como 9 amostras de um bacilo paracoli sorologicamente relacionado ás salmonelas e que também será objeto de uma comunicação à parte.

Considerando-se a frequência dos diferentes tipos por nós encontrados nos casos de diarréias infantis (Tab. I), vê-se que *S. typhi-murium* foi o tipo mais frequente, seguindo-se-lhe o paracoli-bacilo acima mencionado e os tipos *derby*, *newport* e *anatum*. Tais observações divergem das de Taunay (3) que, em 200 exames, encontrou 15 vezes *S. newport*, 5 *typhi-murium*, 3 *anatum*, 3 *paratyphi-B* e apenas 2 *S. derby*. A porcentagem geral de exames positivos para salmonelas é, porém, aproximadamente a mesma, na série de exames realizados por nós e na de Taunay e col. (58 em 459 e 28 em 200, respectivamente).

TABELA I

Incidencia dos diferentes tipos de salmonelas em casos de diarréias infantis (*) de um total de 426 casos examinados em São Paulo durante o ano de 1945.

Tipos de salmonela	No. de casos
S. typhi murium	11
S. derby	10
S. newport	8
S. anatum	6
S. paratyphi-B	3
S. give	3
S. bredeney	2
S. butantan	2
S. bovis-morbificans	2
S. minnesota	2
S. reading	1
S. kapos?ar	1
S. oranienburg	1
S. typhi	1
S. nyborg	1
Paracoli "são paulo"	9
TOTAL	63

(*) Além dêste material proveniente de casos de diarreias infantis, em 33 exames de fezes de adultos foram isoladas 4 salmonelas (1 *typhi murium*, 1 *derby*, 1 *newport*, 1 *enteritidis*) e 1 paracoli com antigenos de salmonelas.

Associação de diferentes tipos de salmonela e de shigelas (*) em sete casos de diarréias infantis

No. do caso	Associação encontrada
1	*S. newport; Paracoli* com antigenos de *Salmonela*
49	*S. anatum; S. derby.*
94	*S. give; S. typhi-murium.*
120	*S. oranienburg; Flexner.*
431	*S. anatum; S. bovis-morbificans.*
494	*S. minnesota; S. paratyphi-B.*
23	*Flexner; Sonne.*

(*) 13 vezes foram isolados bacilos disentéricos do material examinado de fezes de criança com diarreia: 9 Flexner, 2 "Boyd 88", 1 Sonne e 1 Schmitz.

SUMÁRIO

São referidos os resultados relativos á occorrência de salmonelas em 45[9] exames de fezes, 426 de crianças e 33 de adultos, em casos de perturbações ga[s]tro-intestinais na cidade de São Paulo, durante o ano de 1945.

Foram isoladas 58 amostras de salmonelas, filiadas a 16 diferentes tipos e integrando uma porcentagem aproximadas de 12%. Os tipos *typhi-murium, derby, newport* e *anatum* foram os mais frequentes.

ABSTRACT

The results of 459 feces examinations are reported as to incidence of Salmonella, the cases being 426 children and 33 adults with gastro-intestinal disturbances, in the city of S. Paulo, during 1945.

There were isolated 58 samples of Salmonella of 16 different types making up a percentage of about 12%. The types most frequently found were *typhi-murium, derby, newport* and *anatum.*

Agradecimento — Deixamos aqui consignados os nossos agradecimentos ao prof. E. Hormaeche, do Instituto de Higiene de Montevideo, pela colaboração inestimável que nos prestou, possibilitando a vinda a São Paulo do dr. Ciro A. Peluffo, a quem se deve a organização do serviço; ao prof. Pedro de Alcantara e ao dr. Oswaldo Riedel Souza e Silva, da Escola Paulista de Medicina, bem como aos drs. Mario Mursa, Mauricio Corrêa e Fontoura, do Hospital de Indianopolis e ao dr. M. Altenfelder e Silva, do Centro de Saude Santa Cecilia, pelas facilidades criadas à obtenção do material examinado.

BIBLIOGRAFIA

1. *Hormaeche, E. & Peluffo, C. A.* Rev. argent.-norteamer. cienc. méd., **1**:115-121. 1943.
2. *Surraco, N. L.; Peluffo, C. A. & Aleppo, P.* Amer. j. dis. Children, **66**:539-551, 1943.
3. *Taunay, A. de E.; Correa, G. Alvares & Fleury, C. Toledo.* Rev. Inst. Adolfo Lutz, **5**:331-336, 1945.
4. *Surraco, N. L. & Pereyra, V. R. de.* Archs. Urug. Med. Cir. y Espec., **21**:518-532, 1942.

Mem. Inst. Butantan,
19 211-223, 1946.

ESTUDOS SOBRE AS SALMONELOSES EM SÃO PAULO

II. *Um novo tipo de salmonela patogênica para o homem — S. butantan (III.X.XXVI—b—1,5...).* (*)

POR C. A. PELUFFO (**); O. BIER; J. P. AMARAL & E. BIOCCA

(Do Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan, São Paulo, Brasil)

Este novo tipo está representado por 2 amostras, ambas isoladas no Instituto Butantan. A primeira (B 65) provém das matérias fecais de uma criança de 3 meses, de sexo feminino. A doente deu entrada a 1-3-45 no Ambulatorio da Associação Civica Feminina, com febre, diarréia, sintomas gerais de intoxicação, perda de pêso e de apetite, tosse. Medicada com sulfatiazol e submetida a regime alimentar adequado, não apresentou melhoras; em 24-3-45 foi pedido exame de fezes ao Instituto Butantan e dois dias depois veiu a falecer. Fezes muco-sanguinolentas.

A segunda amostra (B 91) foi igualmente isolada de matérias fecais. Tratava-se de uma menina de 6 meses de idade, hospitalizada no Hospital de Indianópolis, da Cruz Vermelha Brasileira. Mesmos sintomas de enterite, com diarréia, vomitos, febre, perda de pêso e de apetite, tosse com expectoração catarral. Não consegue dormir e, em estado grave, é retirada do Hospital pela mãe, presumindo-se que também tenha vindo a falecer. Exame de fezes realizado em 28-3-45. Fezes pastosas. Ambas as amostras não se desenvolveram à semeadura direta, mas somente após enriquecimento em meio de Kauffmann.

Caracteres morfológicos e culturais — Bastonetes gram-negativos, ativamente móveis. Desenvolvimento rápido e abundante em agar simples, em Kristensen e no meio liquido com tetrationato. Colonias redondas, elevadas e transparentes.

Propriedades bioquímicas — Ambas as amostras fermentam, com ácido e gás: glicose, maltose, galactose, xilose, ramnose, arabinose, dulcita, inosita, manita e trealose. Não fermentam (30 dias de incubação a 37°): lactose, sacarose,

---

(*) Trabalho apresentado à Soc. Biol. de S. Paulo, em 8-4-946.

(**) Do Instituto de Higiene de Montevidéo, Lab. de Bacteriologia (Dir.: Prof. E. Hormaeche), subvencionado por uma bolsa dos Fundos Universitarios de Pesquisa para a Defesa Nacional.

Recebido para publicação em 31 de agosto de 1946.

salicina e adonita. Leite tornasolado: acidez inicial seguida de forte a.calini ad-
Hidrogênio sulfurado: +. Indol: —. Gelatina: não liquefazem. Caldo glicer-
nado de Stern: reação positiva (côr violeta) em 3 dias. Em meio de Bitter
Weigmann & Habs. reação positiva com glicose, arabinose, dulcita e ramnose
Meio de Simmons: viragem em 24 horas em presença de g ico e. arabinose. dul-
cita, ramnose e citrato de sódio. Utilização de ácidos organicos (seg. Brown
Duncan & Henry): reação positiva em 24 horas com d — tartarato e com citrato

ESTUDO SOROLÓGICO

Antigenos somáticos — Por aglutinação rápida verificou-se desde logo que
este tipo pertencia ao grupo "E", sendo aglutinado pelos fatores somáticos III
e X, bem como pelo soro XXI. XXVI, mas não pelo soro puro XXI. O soro
somático preparado com *S. münster* aglutina *S. butantan* até o mesmo título
que a amostra homóloga.

Os ensaios de saturação cruzada demonstraram que *S. butantan* satura todas
as aglutininas do soro *münster* e que, reciprocamente, *S. münster* satura todas as
aglutininas do soro *butantan*. Assim sendo, a composição somática de *S. bu-
tantan* pode ser expressada: III.X.XXVI.

Antigenos flagelares — *S. butantan* é um tipo difásico. Sua fase 1 é aglu-
tinada pelo soro paratyphi B em fase 1, assim como por todos os anti-soros que
possuem o fator "b". Por aglutinação lenta só é aglutinada até 1/5 do título
do soro paratifo B; o soro preparado com a fase 1 de S. *urbana*, pelo contrário,
aglutina *S. butantan* no mesmo título que a sua amostra homóloga

Os ensaios de saturação resumidos na Tabela I demonstram que, tal como
o estabeleceu Edwards (1), o antígeno "b" não é homogêneo. De acôrdo com
nossos resultados pode dividir-se, pelo menos, em três frações: a primeira, comum
a todas as amostras que possuem este antígeno; a segunda, que existe em *S. para-
typhi-B, S. abony, S. abortus bovis, S. schleissheim, S. georgii, S. onarimon, S.
mississippi, S. hvittingfoss* e *S. kirkee*, porém não se encontra em *S. butantan*
nem em *S. urbana;* a terceira, que só existe nestes dois últimos tipos.

Embora reconhecendo a complexidade do antígeno "b", preferimos, entre-
tanto, designar a composição antigênica flagelar, fase 1, de *S. butantan* simples-
mente com a letra "b".

A fase 2 de *S. butantan* é aglutinada pelo soro kunzendorf. Em relação aos
fatores puros 2,3,5,6,7 e 10, *S. butantan* foi apenas aglutinada pelos soros 1 e 5.
Por aglutinação lenta se encontrou que a fase 2 de *S. butantan* é aglutinada
pelo soro kunzendorf e, por absorção cruzada, se demonstrou que ambas as fases
são idênticas.

Composição antigênica de S. butantan — A fórmula antigênica completa de *S. butantan* pode, pois, enumerar-se da seguinte maneira: III.X.XXVI-b-1.5 ...

Ação patogênica — *S. butantan* é altamente patogênica para camundongo, por via peritoneal. Quando inoculada em coelho, por via venosa, causa a morte em 24-48 horas, com hemocultura positiva.

TABELA I

Ensaios de saturação. Composição da fase 1 de S. butantan

SOROS	*S. butantan* ou *S. urbana*	*S. paratyphi-B* *S. abony* *S. abortus bovis* *S. georgia* *S. onarimon* *S. mississippi* *S. kristingfoss* ou *S. kirkee*
S. butantan sem saturar	10 000	1 000
saturado com *S. butantan* ou com *S. urbana*	< 200	< 200
saturado com *S. paratyphi-B*	5 000	< 200
S. paratyphi-B sem saturar	1 000	5 000
saturado com *S. butantan* ou com *S. urbana*	< 200	1 000
saturado com *S. paratyphi-B*	< 200	< 200
S. urbana sem saturar	5 000	500
saturado com *S. butantan* ou com *S. urbana*	< 200	< 200
saturado com *S. paratyphi-B*	500	< 200

SUMÁRIO

Das fezes de 2 casos graves de enterite em lactante foi isolado um novo tipo de Salmonela (*S. butantan*), cuja fórmula antigénica é: III.X.XXVI-b-1.5 ...

ABSTRACT

A new Salmonella type is reported from 2 cases of severe enteritis in infants (one known fatality), whose antigenic formula is expressed as: III.X.XXVI-b-1.5 ... The denomination of *Salmonella butantan* is proposed.

BIBLIOGRAFIA

1. *Edwards, P. R. & Bruner, D. W.* The beta phases of the genus *Salmonella* with special reference to two undescribed salmonella types, *J. Inf. Dis.*, 69:220, 1941.

ESTUDOS SOBRE AS SALMONELOSES EM SÃO PAULO

III. *Ocorrência de um bacilo paracoli com antigenos de salmonela (VI, XIII, XXV, Vi) em casos de diarréia infantil*

POR J. P. AMARAL; E. BIOCCA; O. BIER & M. B. ESTEVES

(Do Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan, São Paulo, Brasil)

Durante o ano de 1945, no decurso de pesquisas sobre a incidência de salmonelas em casos de disturbios gastro-istestinais (*), tivemos a oportunidade de isolar, da matéria fecal de 9 crianças, um bacilo paracoli, de comportamento cultural e sorológico homogêneo que, pela sua relativa frequência (1), parece desempenhar um papel importante na etiologia das diarréias infantis em São Paulo. Trata-se de um germe de comportamento bioquímico bastante semelhante ao das salmonelas e de cuja composição antigênica participam os fatores somáticos VI, XIII, XXV, Vi, combinação esta ainda não assinalada para outros microorganismos.

No presente trabalho é feito um estudo pormenorizado desta enterobactéria que, provisoriamente denominamos Paracoli "são paulo" e cuja significação em patologia humana talvez corresponda em importância á que parecem ter os paracolis do grupo "arizona" (2,3,4) em patologia veterinária.

Caracteres morfológicos e culturais — Bastonetes gram-negativos, pouco móveis, sem cápsula, nem esporos. Desenvolvimento fácil e abundante nos meios comuns, bem como em Kristensen e em meio liquido com tetrationato.

Propriedades bioquimicas — As reações bioquímicas foram estudadas com particular cuidado, prolongando-se a observação, no caso das fermentações de açúcares e da liquefação da gelatina, durante 60 dias. Todas as amostras produziram ácido e gás dentro de 24 horas em levulose, galactose, glicose, manose, xilose, maltose, dulcita, manita e sorbita; a lactose foi atacada com ácido apenas, ou com ácido e gás porém lentamente; ramnose, sacarose, inulina, adonita, esculina e salicina não foram fermentadas. A dextrina só foi fermentada por 1 das amostras.

(*) Na série de casos por nós examinada foi o bacilo paracoli em questão isolado aproximadamente com a mesma frequência (cêrca de 15%) que as salmonelas dos tipos typhi-murium, derby e newport.

Recebido para publicação em 31 de agosto de 1946.

Nenhuma das culturas produziu indol, porém todas formaram hidrogênio sulfurado. A gelatina não foi liquefeita por nenhuma das amostras, mesmo após 60 dias. Em correspondência com o seu comportamento em lactose, todas as amostras coagularam tardiamente o leite.

Em meio de Bitter, Weigmam & Habs: reação positiva com glicose, arabinose, dulcita e ramnose. Meio de Simmons: viragem em 24 horas em presença de glicose, arabinose, dulcita, ramnose e citrato de sódio.

Utilização de ácidos orgânicos (seg. Brown, Ducan & Henry): reação positiva em 24 horas com d — tartarato e com citrato.

ESTUDO SOROLÓGICO

Antígenos somáticos — Observações sorológicas feitas com soros somáticos preparados mediante a imunização de coelhos com suspensões aquecidas a 100.° durante 2 horas de amostras de Paracoli "são paulo" (54 e 95) são resumidas na Tabela abaixo (Tabela I):

TABELA I

Sumário das observações sorológicas relativas aos antígenos somáticos

Amostras	SOROS						
	54			95			
	Não abs. —	Abs. com 15 —	Abs. com 1 ou 95 —	Não abs. —	Abs. com *S. newport* (VI), c/ *S. florida* (XXV) e com *S. poona* (XIII)	Abs. com 15 —	Abs. [illegible] 54 —
Paracolis: 54	4 000	10	0		2 000	10 - 20	0
95	> 2 000	10	0	4 000	3 000	10 - 20	0
30	> 2 000	10	0		2 000	10 - 20	0
1	> 2 000	10	0		2 000	10 - 20	0
15	> 2 000	0	0		500	0	
175	> 2 000	0	0		2 000	0	
241	> 2 000	10	0		3 000	10 - 20	0
281	> 2 000	10	0		1 000	10 - 20	0
144	> 2 000	10	0		3 000	10 - 20	0
S. newport (VI)	200			200	0		
S. poona (XIII)	200			200	0		
S. florida (XXV)	40			40	0		

Os números indicam a diluição mais elevada em que ocorreu a aglutinação.
0 — significa ausência de aglutinação na diluição de 1:2.

A análise dos dados resumidos na Tabela I leva a conclusão de que, do ponto de vista de seus antígenos termostáveis, as 9 amostras estudadas de Paracoli "são

paulo" são praticamente idênticas e contém, ao lado dos antígenos somáticos conhecidos VI, XIII e XXV, uma quota maior de antigenos termostaveis desconhecidos. Em relação a êstes últimos, o fato de persistir um título de 1/10 tanto no caso de soro anti-54, como no caso do soro anti-95 para 7 das amostras experimentadas, titulo que só reduziu a O (para o soro 95) após absorção com a amostra 54, poderia justificar a idéia de uma subdivisão em 2 grupos: um constituido pelas amostras 15 e 175, contendo apenas a fração antigênica maior e outro formado pelas restantes 7 amostras, que, em adição ao antigeno somático desconhecido principal, conteria também um antigeno menor.

Antígeno Vi — A demonstração de antígeno Vi pode ser feita para todas as amostras de Paracoli "são paulo", usando-se 4 diferentes soros Vi: um soro antitífico comercial (Lab. Torres, São Paulo), preparado em cavalo mediante a técnica de Felix e tres soros de coelho, sendo 1 proveniente do Laboratório de Bacteriologia do Instituto de Higiene de Montevidéo e 2 outros preparados neste Laboratório respectivamente contra a amostra de S. typhi "Ty 2" e contra a amostra 54 de Paracoli "são paulo". As observações feitas com estes soros figuram sucintamente nas Tabelas 2 e 3.

TABELA II

Títulos aglutinantes obtidos com o sôro Vi preparado com a amostra 54

Amostras	Titulo flagelar	Titulo somático
Paracoli 54	10 000	5 000
S. newport (VI)	—	200
S. poona (XIII, XXIII) . .	—	200
S. typhi, "Ty 2" (IX, Vi) ..	—	200

TABELA III

Aglutinações rápidas com diferentes soros Vi

Amostras. Composição antigênica	Soros Vi			
	Torres	Peluffo	Ty 2	Paracoli 54
S. ballerup XXIX, [Vi], z14, —.	++	++	++++	++
S. coli 1 XXX1, [Vi], 1, 5 ..	++	++	++	++
S. hormaechei XXIX, [Vi], z30, —.	+++	++++	++++	++++
Paracoli "são paulo" (amostras 1-30-95-144 — VI, XIII, XXV, 15-241-281-175) [Vi], .—.	++	+++	++++	+++

Antígenos flagelares — Provas sorológicas realizadas com um soro obtido mediante a imunização de coelhos com suspensão de cultura de 24 hs. em meio liquido da amostra 54 morta pelo formol deram os resultados que vêm compendiados na Tabela 4.

TABELA IV

Titulos aglutinantes obtidos com o sôro flagelar preparado com a amostra 54 (Titulo somático 1:500)

Amostras	Titulo flagelar
Paracolis são paulo 54, 1, 15, 30, 95, 281	5 000
Paracolis são paulo 144, 241	10 000
Paracolis são paulo 175	4 000

O mesmo soro foi experimentado, em aglutinação rápida, com todos os antigenos flagelares de fase 1 e 2 conhecidos das amostras de salmonelas existentes em nossa coleção (*), com resultados inteiramente negativos. Por outro lado, todas as amostras de Paracoli "são paulo" foram experimentadas com os soros flagelares conhecidos de que dispomos no nosso laboratório (**), com resultados também completamente negativos.

Considerando-se a hipótese de tratar-se de um germe difásico, procuramos induzir artificialmente uma segunda fase, semeando as diferentes amostras em agar semisólido adicionado de soro flagelar anti-54. Após 24 horas a 37.º, foi observado crescimento compacto nas camadas superiores do agar, sem tendência para difusão. Os poucos elementos que conseguiram difundir até a parte inferior do meio semi-sólido foi verificado serem em sua maioria, imóveis. As provas de aglutinação com as amostras "induzidas" e as originais deram praticamente o mesmo resultado.

Composição antigênica do Paracoli "são paulo" — Dos estudos sorológicos referidos pode-se concluir que as 9 amostras de paracoli estudadas encerram, ao lado de fatores somáticos conhecidos (VI,XIII,XXV,Vi), antigenos somáticos e flagelares desconhecidos (esta conclusão, no que se refere aos antígenos flagelares,

(*) Convem notar que faltam apenas em nossa coleção as amostras representativas dos antígenos z seguintes: I, 2, 3, 5, 7, 8, 9, 11, 15, 16, 18, 19, 25 e 26.

(**) Soros somáticos: I — II — III — IV — V — VI.XIV.XXIV — VII — VIII — IX — X.XXVI — XI — XIII.XXIII.XXXV — XV — XVI — XVII —XVIII — XIX — XX — XXI — XXII — XXIII — XXIV — XXV — XXVII — XXVIII — XXIX — XXX — XXXIII — XXXIV — XXXV — XXXVIII; soros flagelares: a — b — c — d — eh — en — enx — f — fgt — gom — goq — gp — gst — h — i — k — lv — lw — m — nxz17 — p — q — r — s — t — u — v — w — y — z — z4 — z6 — z10 — z12 — z13 — z14 — z17 — z27 — z28 — z29 — 1, 5 — 1, 7 — 2 — 3 — 5 — 6 — 7 — 10 — 13.

está sujeita á ressalva anteriormente já feita quanto aos soros correspondentes aos antigenos z que faltam em nossa coleção).

Tendo sido negativas as tentativas de indução de uma 2ª. fase, pensamos tratar-se de um germe monofásico, cuja fórmula antigènica pode ser assim expressa: VI.XIII.XXV,^{x},Vi,^{x},-.

DISCUSSÃO

Os bacilos paracoli estudados neste trabalho constituem um grupo homogêneo, quer do ponto de vista bioquimico, quer do ponto de vista sorológico. Tal como o grupo "arizona" descrito por Edwards e seus col. (2,3), os Paracoli "são paulo" apresentam comportamento bioquimico muito semelhante ao das salmonelas, de que só se diferenciam pelo fato de fermentarem lentamente a lactose e de coagularem tardiamente o leite (*) (ao contrário, porém, dos Paracoli "arizona", as amostras "são paulo" não são capazes de liquefazer a gelatina, nem mesmo após 60 dias).

Em 1940, Kauffmann (5), orientado por uma definição puramente sorológica do gênero *Salmonella*, incluiu em seu esquema 5 amostras típicas de bacilos coli (designados como *Salmonella coli* 1,2,3,4,5), pelo fato de apresentarem antígenos somáticos ou flagelares de salmonelas.

Tal orientação, porém, não foi seguida por outros especialistas no assunto (2,3) e o próprio Kauffmann recentemente a abandonou (6). Não parece justificável, com efeito, que se adote um critério puramente sorológico na definição de um gênero, quando sabemos que bactérias completamente não relacionadas umas ás outras, como, p. exemplo, o pneumococo tipo II e o bacilo de Friedlander tipo B, podem apresentar importantes frações antigênicas em comum. Reconhecendo a validez dêste argumento, Kauffmann, em 1942 (7) já modificava a sua definição de 1937, caracterizando as salmonelas pelo conjunto dos seus caracteres culturais, bioquímicos e sorológicos.

A dificuldade taxonòmica resulta, porém, do fato de existirem *germes de comportamento intermediário* para os quais melhor se nos afigura uma classificação provisória no grupo "Paracoli". Apesar das excepções, existe, afinal, um critério bioquímico para a caracterização do gênero *Salmonella* e, por isso, quando encontramos uma variante de *S. eastbourne* que produz indol ou uma variante de *S. anatum* que fermenta a lactose, não surge dúvida quanto ao classificá-las

(*) É estranho que o Subcomité de Salmonelas, em 1939, tenha definido o gênero: "Failing to ferment sucrose or to clot milk and rarely fermenting lactose...", visto como, de acôrdo com a experiencia geral, a fermentação lenta da lactose e a coagulação tardia do leite são fenomenos correlatos.

como salmonelas, pois, de um lado, temos a possibilidade de identificá-las sorologicamente e, por outro lado, sabemos que há representantes daquelas amostras que se comportam de acôrdo com a definição genérica.

No caso dos paracoli em questão, trata-se muito provavelmente de germes intermediários que progressivamente adquiriram a capacidade de atacar a lactóse e não é impossivel que, de futuro, consigamos demonstrar a existência do mesmo germe, no seu estágio de incapacidade de fermentar a lactose, isto é, comportando-se como uma verdadeira salmonela. Caso fosse este, porém, um comportamento excepcional da amostra (sendo perfeitamente igual ao dos paracoli o comportamento sorológico), ainda caberia dúvida quanto á sua classificação, se no gênero *Salmonella* ou se no grupo *Paracoli*.

Recentemente, Edwards (8) refere o isolamento, das fezes de um caso de colite em criança, de um germe *não fermentador da lactose e sorologicamente relacionado ás salmonelas* (antigeno "O" igual ao paracoli tipo 3 de Edwards, Cherry & Bruner; antigeno H — z_4, z_{23}, z_{26}, porém classifica-o não como salmonela, mas sim como um paracoli do grupo "arizona".

Tal orientação, pouco compreensivel á primeira vista, é, sem dúvida, a mais segura, em face das incógnitas que ainda apresenta a sistemática destes germes intermediários da família *Enterobacteriaceae*.

O estudo do grupo de paracolis por nós provisoriamente denominado "são paulo" merece ser prosseguido, em virtude de sua relativa frequência e de sua possível significação como agente etiológico de diarréias infantis.

SUMÁRIO

Em 426 exames de fezes de casos de diarréia infantil em São Paulo, foi isolado 9 vezes um bacilo paracoli portador de antigenos de salmonela (VI, XIII, XXV, Vi). O estudo bioquimico sorológico pormenorizado destas 9 amostras mostrou que se trata de um grupo homogêneo de microorganismos, para a qual se propõe a designação geral de Paracoli "são paulo".

ABSTRACT

From the feces of 426 cases of infantile diarrhoea 9 strains of a paracolon bacillus have been isolated. The microorganism differs from salmonellas in its biochemical property only in that it ferments lactose and coagulates milk. It shares some of the "O" salmonella antigenes (VI, XIII, XXV, Vi), and contains, in addition, unknown somatic and flagellar antigens.

The denomination Paracoli "são paulo" is proposed for the new microorganism which is believed to be of epidemiological significance as a cause of infantile diarrhoea in São Paulo.

Agradecimentos — Agradecemos ao dr. P. R. Edwards, do Departamento de Patologia Animal do "College of Agriculture and Home Economics", da Universidade de Kentucky, pela sua amabilidade confirmando a composição antigênica somática de 2 amostras de paracoli "são paulo" que lhe enviamos, assim como por valiosas sugestões em relação à posição sistemática do microorganismo em apreço.

BIBLIOGRAFIA

1. *Peluffo, C. A.; Bier, O.; Amaral, J. P. do & Biocca, E.* Mem. Inst. Butantan, **19**, 1946 (1.ª comunicação, em publicação).
2. *Peluffo, C. A.; Edwards, P. R. & Bruner, D. W.* J. Infect. Dis., **70**:185-192, 1942.
3. *Edwards, P. R.; Cherry, W. B. & Bruner, D. W.* J. Infect. Dis., **73**:229-238, 1943.
4. *Hinshaw, W. R. & McNeil, E.* J. Bact., **51**:281, 1946.
5. *Kauffmann, F.* Acta Path. et Microb. Scandinav., **18**:225-246, 1941.
6. *Kauffmann, F.* Acta Path. et Microb. Scandinav., **22**:144-150, 1945.
7. *Kauffmann, F.* Acta Path. et Microb. Scandinav., **20**:240-241, 1943.
8. *Edwards, P. R.* J. Bact., **49**:513-514, 1945.

HEMAGLUTININAS NOS VENENOS DE SERPENTES SULAMERICANAS

POR F. W. EICHBAUM

(Do Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan, São Paulo, Brasil)

A atividade hemolítica de certos venenos ofídicos tem sido objeto de cuidadosos trabalhos, o mesmo não ocorrendo com o poder hemaglutinante destas substâncias cuja bibliografia é relativamente escassa.

Os primeiros autores (Weir-Mitchell; Lacerda, 1860) que observaram um "fusionamento" das hemátias em contato com os venenos, aparentemente ainda não distinguiram bem os fenômenos da aglutinação e da hemólise (Phisalix). Só nos trabalhos posteriores de Flexner e Noguchi (1), Noc (8) e outros (4, 5, 6, 9, 10,) foi feita uma distinção entre o poder hemaglutinante e hemolisante dos venenos ofídicos. Houssay & Negrette (2) classificaram os diversos venenos de acôrdo com o seu poder aglutinante na ordem seguinte: *Ancistrodon blomhoffi, L. jararacussu, L. lanceolatus, L, neuwiedii, L. atrox, Ancistrodon piscivorus, L. alternatus, Bungarus fasciatus, L. ammodytoides.* Nos demais venenos (não enumerados pelos autores) não foram obtidas reações bem nítidas, si bem que muitos dêles, em concentrações fortes, tivessem aquela propriedade. Os glóbulos mais aglutináveis eram os de coelho, depois os de homem, carneiro, cavalo e cobaia. O aquecimento a 70 graus destruiu o poder aglutinante de *L. alternata*.

Kitijima (3) verificou também uma destruição da ação aglutinante do veneno de *Lachesis trimeresurus* pelo aquecimento a 70 graus durante meia hora, processo que não alterava a atividade das hemolisinas. Michel (7) conseguiu separar a fração aglutinante da fração tóxica e hemolisante do veneno de *Crotalus adamanteus*, passando o veneno por um filtro coloidal que reteve em primeiro lugar as aglutininas.

O presente estudo que abrange as observações em 9 espécies de serpentes venenosas brasileiras e uma espécie de Costa Rica, revela a existência de grandes diferenças quantitativas e qualitativas no poder aglutinante dos seus venenos. O conhecimento dessas diferenças poderia auxiliar a classificação de cer-

Recebido para publicação em setembro de 1946.

tos exemplares morfologicamente próximos, como também auxiliaria na identificação de um veneno de proveniência desconhecida. Citaremos 2 exemplos a título demonstrativo dessas afirmações: 1) um veneno de *Bothrops atrox*, original de Costa Rica não possue poder aglutinante contra hemátias de coelho, de cão, de homem, etc., enquanto que o veneno de *Bothrops atrox* brasileira aglutina fortemente hemátias de coelho. Esta diferença no poder aglutinante entre serpentes tidas como da mesma espécie, corre paralela com a observação de que o veneno origiual de Costa Rica é mal neutralizado pelos soros antibotrópicos sulamericanos (comunicação pessoal do Dr. J. B. Arantes, subdiretor do Instituto Butantan). Tais fatos parecem sugerir uma revisão da sistemática relativa aos vários representantes de *Bothrops atrox*.

2) Há pouco tempo recebemos no nosso Instituto uma remessa de veneno sêco de *Bothrops atrox* (proveniente de Minas Gerais), cuja aparência fazia suspeitar estar o mesmo de mistura, pelo menos em parte, com veneno de outra espécie ofidica. O test de aglutinação revelou uma aglutinação característica para a *Bothrops jararara* (resp. jararacuçú) e não de *B. atrox*. Como mostrarão os protocolos detalhados, tal classificação é possivel somente em certos casos; em outros a classificação poderá ser feita por exclusão.

MÉTODOS

Foi testado o poder aglutinante do veneno de 9 espécies ofidicas brasileiras contra as hemátias de 7 espécies de mamalias e 1 espécie de aves, (cf. os protocolos sub-sequentes).

1. Test qualitativo: Aglutinação em lâmina. Uma gota da solução de veneno a 10 mg/cm³ (= 1%) (*) — preparada do veneno sêco — era misturada com uma gota da suspensão de hemátias a 10%. Os dois liquidos eram emulsionados com o canto de uma lâmina e os resultados foram lidos 5 minutos após.

2. Test quantitativo: Uma solução de veneno a 1% (10 mg/cm³) foi diluida em progressão geométrica (á razão de 2) e distribuida para 15 tubos de maneira que cada um continha 0,5 cm³ de diluições consecutivas de veneno

(*) As soluções de veneno a 1% foram preparadas com venenos sêcos, provenientes da coleção do Instituto. Estes venenos representam misturas de numerosos exemplares pertencentes à mesma espécie, de maneira que eventuais diferenças individuais aqui não aparecem. O veneno obtido em estado sêco (sêco em estufa a 37 graus) era redissolvido em água fisiológica a 0,9% no caso dos venenos botrópicos; nas demais espécies os venenos eram dissolvidos num pequeno volume de solução salina concentrada de 15-18% e em seguida levados à concentração fisiológica pela adição de água destilada.

O 15º tubo — que serviu como contrôle — continha unicamente 0.5 cm³ de NaCl fisiol. Esta série de diluição (15 tubos) foi preparada em 8 filas paralelas, correspondendo as 8 espécies de hemátias que foram juntadas em seguida em quantidade de 0,05 cm³ de uma suspensão a 20% para cada tubo.

As leituras de aglutinação foram feitas depois de uma hora à temperatura ambiente e depois de 20 horas na geladeira.

A intensidade da aglutinação foi notada da seguinte maneira:

++++ = aglutinação fortissima (sobrenadante branco)
+++ = " forte
++ = " média
+ = " fraca
± = " duvidosa
0 = " ausente

Outros fenômenos, como hemólise, que ocorreu principalmente nas concentrações mais fortes dos venenos, ou a transformação da hemoglobina em methemoglobina, não são registrados nestes protocolos e serão tratados detalhadamente em outra publicação.

Resultados:

I. Test qualitativo (em lâmina)

TABELA I

Aglutinação em lâminas (test qualitativo)

Veneno	Hemátias							
	coelho	cavalo	cobaia	cão	carneiro	(*) homem	boi	galinha
B. jararaca	++++	o	++	++++	o	++++	++++	o
B. atrox	+++	o	o	o	o	o	o	o
B. jararacussu	++++	o	++	++++	o	++++	++++	o
B. alternata	o	o	o	o	o	o	o	o
B. neuwiedii	++++	++	++++	++++	++	++++	++++	++
B. itapetiningae	o	o	o	o	o	o	o	o
B. cotiara	±	o	o	o	o	o	o	o
C. terrificus terrificus	±	+	o	o	o	o	o	o
Micrurus frontalis ...	o	o	o	o	o	o	o	+
B. atrox Costa Rica	o	o	o	o	o	o	o	o

(*) A. hemátias dos 4 grupos sanguineos são aglutinados da mesma forma.

TABELA II

Aglutinação em tubos (test quantitativo)

Limite da ação hemaglutinante em γ/cc dos vários venenos (*)

Resultados depois de 1 hora e de 20 horas

Veneno	HEMATIAS															
	coelho		cavalo		cobaia		cão		carneiro		boi		homem		galinha	
	1 h	20 h	1 h	20 h	1 h	20 h	1 h	20 h	1 h	20 h	1 h	20 h	1 h	20 h	1 h	20 h
B. jararaca	39	1	—	—	312	78	156	78	—	—	2500	1250	625	78	—	—
B. atrox	1250	312	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	5000	—	—
B. jararacussu	4	1	—	—	18.5	2	18.5	2	—	—	312	156	156	78	—	18.5
B. alternata	—	312	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	5000
B. neuwiedii	78	1	156	156	2	1	78	18.5	625	39	312	156	312	312	312	39
B. itapetiningae .. .	—	2500	—	—	—	2500	—	—	—	—	—	—	—	10000	—	—
B. cotiara	5000	625	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	156
Crotalus terrificus ..	—	10000	10000	5000	—	10000	—	2500	—	—	—	—	—	—	—	—
Micrurus frontalis ..	10000	625	2500	625	10000	625	—	—	—	—	—	—	—	—	—	10000

(*) Note-se que o maior poder aglutinante corresponde ao valor mais baixo em γ.

II. Test quantitativo em tubos

A Tabela II dá o titulo máximo de aglutinação das diferentes hemátias pelos vários venenos.

Como reação positiva (título final) foram consideradas nesta Tabela somente as aglutinações de ++ a ++++, omitindo-se as aglutinações fracas e duvidosas.

Resultado: Nesta Tabela, o número de venenos que aglutinam várias hemátias aparece maior, em comparação com o test qualitativo (Tabela I), especialmente devido a inclusão das aglutinações depois de 20 horas e dos venenos que aglutinam só nas concentrações mais fortes (10 000, 5 000 e 2 500 gamas ou seja nas diluições 1/1 1/2 e 1/4 da sol. de veneno a 1%).

Os venenos de *Bothrops jararaca* e de *Bothrops jararacussu*, que no test qualitativo se comportam iguais, distinguem-se no test quantitativo pela intensidade da reação. Sem um exame comparativo do veneno de vários indivíduos destas duas espécies, não se pode concluir, se esta diferença quantitativa tem alguma significação para distinguir os dois venenos.

A Tabela III dá um exemplo de um protocolo detalhado de um test quantitativo de aglutinação.

Neutralização das aglutininas dos venenos botrópicos pelo sôro anti-Bothrops jararaca

O poder aglutinante do veneno de *Bothrops jararaca* sôbre as hemátias de coelho é inhibido em presença do sôro anti-*Bothrops jararaca*. Como resulta da Tabela seguinte (IV), o poder antiaglutinante de um sôro não tem nenhuma relação com o seu poder antineurotóxico (*) (dosado em pombos). Assim, o sôro 19 que neutraliza 2,4 mg de veneno (por cada cm³ de sôro) possue um poder antiaglutinante 4 vêzes menor do que o sôro 18 que neutraliza só 2,2 mg.

O sôro anti-*Bothrops jararaca* inhibe também a aglutinação das hemátias de coelho provocada por outros venenos botrópicos (*B. jararacussu*, *B. atrox* e *B. neuwiedii*); ocorre ainda com o mesmo sôro um fenômeno interessante, isto é,

(*) Chamamos de poder antineurotóxico aquela qualidade de sôro que neutralisa a ação tóxica geral do veneno, manifestando-se nos pombos injetados intravenosamente por espasmos clônicos, geralmente mortais. Deixamos fóra de discussão si êste efeito tóxico é causado por uma fração neurotóxica específica ou devido a ação conjunta de vários princípios tóxicos adjuvantes como a histamina libertada, a coagulase, causadora de uma coagulação intravasal, ou ainda outros fatores.

Tabela III

Ação hemaglutinante do veneno de B. jararaca

Tubo No.	Veneno 1% Diluição	Quantidade de veneno (em gamas) por cm³	Aglutinação com hemátias (*) de															
			coelho		cavalo		cobaia		cão		carneiro		boi		homem		galinha	
			depois de															
			60'	20 h	60'	20 h	60'	20 h	60'	20 h	60'	20 h	60'	20 h	60'	20 h	60'	20 h
1	1:1	10 000	++++	++++	0	0	++++	++++	++++	++++	0	0	++++	++++	++++	++++	0	+
2	1:2	5 000	++++	++++	0	0	++++	++++	++++	++++	0	0	++++	++++	++++	++++	0	±
3	1:4	2 500	++++	++++	0	0	++++	++++	++++	++++	0	0	++++	++++	++++	++++	0	0
4	1:8	1 250	++++	++++	0	0	++++	++++	++++	++++	0	0	±	++++	++++	++++	0	0
5	1:16	625	++++	++++	0	0	+++	+++	++++	+++	0	0	0	+++	+++	++++	0	0
6	1:32	312	++++	++++	0	0	++	+++	+++	++++	0	0	0	0	+	++++	0	0
7	1:64	156	+++	++++	0	0	+	++	++	++++	0	0	0	±	0	++++	0	0
8	1:128	78	+++	++++	0	0	+	++	+	+++	0	0	0	0	0	+++	0	0
9	1:256	39	++	++++	0	0	±	+	0	±	0	0	0	±	0	+	0	0
10	1:512	18.5	±	++++	0	0	0	+	0	0	0	0	0	0	0	±	0	0
11	1:1 024	9.25	0	++++	0	0	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	1:2 048	4.125	0	++++	0	0	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13	1:4 096	2.06	0	+++	0	0	+	±	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	1:8 192	1.03	0	++	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	NaCl fisiol	- -	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

(*) 0,05cc de uma suspensão a 20%.

TABELA IV

*Ação inhibidora de 4 soros anti-*Bothrops jararaca *sôbre a aglutinação de hemátias de coelho pelo veneno de* Bothrops jararaca

Tubo N.	Veneno 1 mg/cm³	Hemátias de coelho 2%	NaCl fisiol.	Sôro (16, 17, 18 e 19)		Aglutinação depois de 1 hora em presença do sôro (temperatura ambiente)			
				Diluição	Quantidade	Sôro No. 16 (*) (2,1 mg)	Sôro No. 17 (*) (1,9 mg)	Sôro No. 18 (*) (2,2 mg)	Sôro No. 19 (*) (2,4 mg)
1	0,25 cm³	0,5 cm³	—	1:1	0,25	[illegible]	o	o	o
2	0,25 cm³	0,5 cm³	—	1:2	0,25	o	o	o	o
3	0,25 cm³	0,5 cm³	—	1:4	0,25	o	o	o	o
4	0,25 cm³	0,5 cm³	—	1:8	0,25	+	±	o	++
5	0,25 cm³	0,5 cm³	—	1:16	0,25	++	+++	o	++++
6	0,25 cm³	0,5 cm³	—	1:32	0,25	+++	++++	++	++++
7	0,25 cm³	0,5 cm³	—	1:64	0,25	++++	++++	++++	++++
8	0,25 cm³	0,5 cm³	—	1:128	0,25	++++	++++	++++	++++
9	0,25 cm³	0,5 cm³	—	1:250	0,25	++++	++++	++++	++++
10	0,25 cm³	0,5 cm³	—	1:512	0,25	++++	++++	++++	++++
11	0,25 cm³	0,5 cm³	0,25	—	—	++++	++++	++++	++++
12	—	0,5 cm³	0,5	—	—	o	o	o	o

(*) Os mg entre parêntesis indicam o poder antineurotóxico por cm³ de sôro testado em pombos (técnica de Vital Brazil).

inhibe a ação aglutinante do veneno *B. neuwiedii* sôbre as hemátias de carneiro (e menos nitidamente, sôbre as hemátias de cavalo), muito embora o próprio veneno de *Bothrops jararaca* não possua aglutininas dirigidas contra estas duas espécies de hemátias (Tabela V).

TABELA V

Hemátias	Veneno	Mistura do veneno com:			
		a NaCl fis.	b Sôro normal cavalo (*)	c Sôro anti-*B. jararaca* (*)	d Sôro anti-*Crotalus terrificus* (*)
		AGLUTINAÇÃO			
Coelho	*B. jararaca*	++++	++++	o	++++
Carneiro	*B. jararaca*	o	o	o	o
Coelho	*B. neuwiedii*	+++	+++	o	++++
Carneiro	*B. neuwiedii*	+++	++++	o	+++

(*) Os tubos com sôro normal e com sôro anticrotálico mostram depois de cêrca de 5-10 minutos uma hemólise que interfere com a leitura da aglutinação. Dentro dêste intervalo os resultados são bem nítidos. O sôro antibotrópico inhibe tanto aglutinação como a hemólise.

A hemaglutinina dos venenos botrópicos como fração separada

Absorção do veneno de *B. jararaca* com hemátias de coelho, de cobaia, de cão ou de homem remove não somente as aglutininas homólogas, mas também as dirigidas contra as três espécies heterólogas (**).

Dai pode-se concluir que as aglutininas ativas contra as hemátias de diferentes espécies constituem, de fato, uma única substância.

O aquecimento do veneno de *Bothrops jararaca* a 60 graus durante 30 minutos destróe completamente o poder aglutinante.

Em seguida procuramos verificar si a aglutinina do veneno de *Bothrops jararaca* representa uma fração distinta dos demais componentes do veneno, a saber: da coagulase, da lecitinase, da neurotoxina e da dermatotoxina. Para êste fim comparamos os resultados obtidos com:

a) o veneno absorvido com hemátias de coelho (2cm³ da solução de veneno a 1°/₀₀ + 2 cm³ de hemátias de coelho a 20%);

b) veneno tratado com hemátias de cavalo (2 cm³ de veneno a 1°/₀₀ + 2 cm³ de hemátias de cavalo a 20%);

c) veneno nativo (2cm³ de veneno a 1°/₀₀ + 2 cm³ de água fisiológica):

Nos respectivos testes usaram-se quantias iguais dos sobrenadantes de *a* e *b* e do líquido *c*, que continha a mesma quantidade de veneno por cm³ como a) e b).

TABELA VI

Diluição	Veneno absorvido com hemátias de coelho 5,0 gamas por 1/5 cm³ + 1/5 cm³ plasma			Veneno nativo 5,0 gamas por 1/5 cm³ + 1/5 cm³ plasma		
	Coagulação depois de					
	10'	20'	30'	10'	20'	30'
1:1	+	+	+	+	+	+
1:2	+	+	+	+	+	+
1:4	+	+	+	+	+	+
1:8	+	+	+	+	+	+
1:16	+	+	+	+	+	+
1:32	—	+	+	±	+	+
1:64	—	—	+	—	—	+

± = Coagulação parcial
+ = Coagulação total

(**) Visto que as hemátias de coelho são mais fortemente aglutinadas pelo veneno de jararaca do que as outras hemátias (de homem, de cão, de cobaia) a absorção total das aglutininas é mais fácil com as hemátias de coelho do que com as três outras hemátias que precisam ser adicionadas repetidamente até o esgotamento completo das aglutininas.

1. *Coagulase*: O poder coagulante do veneno de *Bothrops jararaca* nada sofre pela absorção com hemátias de coelho. Tanto o veneno nativo como o absorvido com hemátias de coelho ou o tratado com hemátias de cavalo coagulam o plasma de coelho até o mesmo título.

2. *Lecitinase*: O protocolo seguinte (Tabela VII) mostra que a absorção de veneno com hemátias de coelho — suficiente para remover tôdas as aglutininas — não provoca alteração da lecitinase do veneno. É importante salientar êste fato porque antigamente as aglutininas e hemolisinas foram consideradas como substâncias idênticas.

3. O poder neurotóxico do veneno, testado em pombos (de acôrdo com a técnica de Vital Brazil) fica inalterado pela absorção com as hemátias de coelho: a dose letal mínima, tanto para o veneno absorvido como para o veneno nativo era entre 25 e 50 gamas.

4. *Dermatotoxina*: A ação dermatotóxica do veneno — testada por injeção intradermica na pele depilada do abdomem de coelhos — não é enfraquecida pelo tratamento com hemátias aglutináveis (coelho) ou inaglutináveis (cavalo).

Estas observações provam, que a aglutinina do veneno de *Bothrops jararaca* constitue uma fração separada do veneno, diferente das demais frações: coagulase, lecitinase, neurotoxina, dermatotoxina (*).

RESUMO

Foi estudado neste trabalho a ocorrência nos venenos de nove espécies ofídicas brasileiras, de hemaglutininas para hemátias de coelho, cavalo, cobaia, carneiro, cão, boi, homem e galinha.

Enquanto alguns venenos não possuem hemaglutininas outros mostram hemaglutininas muito ativas. Como acontece com certos extratos vegetais com poder hemaglutinante (abrina, ricina, extrato de lentilhas e de feijões; Landsteiner) êstes venenos contêm hemaglutininas que agem especificamente sôbre as hemátias de certas espécies, deixando inalteradas as hemátias de outras. As diferenças qualitativas e quantitativas que existem no poder aglutinante de vários venenos, poderiam servir não só como meio de identificação de venenos

(*) Preferimos a expressão dermatotoxina à "hemoragina" dos outros autores, tendo verificado que a ação dermatotóxica é devida, pelo menos, a dois fatores diferentes: 1) um fator hemoragisante — necrotisante e termolábil, neutralisável pelo sôro específico; 2) um fator edemisante, termo-resistente, não neutralisável pelo sôro.

TABELA VII

Atividade de lecitinase nos venenos nativos e absorvidos por hematias aglutináveis (coelho) e não aglutináveis (cavalo).

Tubo No.	Veneno 0,5 mg/cm³	Buffer pH 7,4	Lecitina 0,5 mg cm³	Hematias cavalo 10%	NaCl fisiol.	Veneno *a* (trat. com hemát. coelho)				Veneno *b* (trat. com hemát. cavalo)				Veneno *c* (nativo)			
						Hemólise depois de											
						30'	60'	120'	20 h	30'	60'	120'	20 h	30'	60'	120'	20 h
1	0,025 cm³	0,2 cm³	0,2 cm³	0,2 cm³	para 2,0 cm³	0	0	0	++++	0	0	0	++++	0	0	0	++++
2	0,05 cm³	0,2 cm³	0,2 cm³	0,2 cm³	2,0 cm³	0	0	0	++++	0	0	0	++++	0	0	0	+++
3	0,1 cm³	0,2 cm³	0,2 cm³	0,2 cm³	2,0 cm³	0	0	0	++++	0	0	0	++++	0	0	0	+++
4	0,2 cm³	0,2 cm³	0,2 cm³	0,2 cm³	2,0 cm³	0	0	0	++++	0	0	0	++++	0	0	0	++++
5	0,4 cm³	0,2 cm³	0,2 cm³	0,2 cm³	2,0 cm³	0	0	±	++++	0	0	++	++++	0	0	±	++++
6	0,8 cm³	0,2 cm³	0,2 cm³	0,2 cm³	2,0 cm³	0	++++	++++	++++	0	++++	++++	++++	0	++++	++++	++++
7	1,0 cm³	0,2 cm³	0,2 cm³	0,2 cm³	2,0 cm³	0	++++	++++	++++	0	++++	++++	++++	0	++++	++++	++++
8	—	0,2 cm³	0,2 cm³	0,2 cm³	2,0 cm³	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0

0 — Hemólise ausente
\+ — Hemólise fraca
++ — Hemólise média (± 50%)
+++ — Hemólise forte (quase total)
++++ — Hemólise total (100%)

de proveniência desconhecida, como também poderiam auxiliar a classificação de serpentes morfologicamente afins.

O sôro anti-*Bothrops jararaca* inhibe o poder aglutinante do veneno homólogo e age igualmente sôbre os outros venenos botrópicos hemaglutinantes. Apesar do veneno de *Bothrops jararaca* não aglutinar as hemátias de carneiro ou de cavalo, o anti-sôro correspondente inhibe a aglutinação destas hemátias pelo veneno de *Bothrops neuwiedii*. Não existe relação quantitativa entre o poder antineurotóxico e antiaglutinante dos vários soros anti-*B. jararaca*. A absorção dos venenos hemaglutinantes com uma das espécies de hemátias aglutináveis remove simultaneamente as aglutininas contra tôdas as espécies de hemátias aglutináveis. Daí se conclue que a aglutinina ativa sôbre diferentes hemátias, é uma única substância.

A hemaglutinina representa uma fração distinta das outras frações de veneno: neurotoxina, dermatotoxina, lecitinase e coagulase, como foi provado pelo fato de que a absorção do veneno com hemátias aglutináveis (de coelho) deixa inalterada a atividade dos 4 outros componentes do veneno.

O aquecimento do veneno de *Bothrops jararaca* a 60 graus, durante 30 minutos, destróe o seu poder aglutinante.

ABSTRACT

This paper deals with the occurence of hemagglutinins in the venoms of Brazilian poisonous snakes. There were tested, on the whole, the venoms of 9 snake species (*) against 8 different blood cells (**). Whereas some of the venoms lack any hemagglutinating power, others — principally the *Bothrops* venoms — exhibit a strong hemagglutinating activity. Similar to certain plant extracts, the hemagglutinins in snake venoms show a well defined specificity of action, which is directed towards a limited number of blood cells, whereas others are not affected at all. The quantitative and qualitative differences in the agglutinating power of different snake venoms, might serve not only as a means to identify certain venoms of unknown provenience but might also offer useful help in classifying morphologically similar individuals.

The anti-*Bothrops jararaca* serum inhibits the agglutinating power of the homologous venom as well as of all the other hemagglutinating *Bothrops* venoms such as *B. jararacussu*, *B. neuwiedii* and *B. atrox*. In spite of the fact

(*) *Bothrops jararaca, B. atrox, B. jararacussu, B. alternata, B. Neuwiedii, B. Itapetiningae, B. cotiara, Crotalus terrificus terrificus, Micrurus frontalis.*

(**) Rabbit, horse, guinea-pig, dog, sheep, ox, man, chicken.

that the *Bothrops jararaca* venom does not agglutinate by itself horse or sheep bloodcells, its antiserum prevents the agglutination of these cells by the *Bothrops neuwiedii* venom. There does not exist a quantitative relationship between the antineurotoxic and the antihemagglutinating power of different anti-*Bothrops jararaca* sera.

Absorption of the hemagglutinating venoms with agglutinable cells from one species removes simultaneously the reactivity towards all the other agglutinable blood cells. It is concluded therefrom that the agglutinin directed against various blood cells, is one single substance. The hemagglutinin represents a separate venom fraction, different from the neurotoxic, dermatotoxic, coagulase and lecithinase fraction: a *Bothrops jararaca* venom absorbed with rabbit blood cells looses its hemagglutinating power but retains its full activity as far as the 4 other mentioned fractions are concerned.

Heating of *B. jararaca* venom to 60° for 30 minutes destroys its hemagglutinating power.

BIBLIOGRAFIA

1. *Flexner, S. & Noguchi, H.* Cit. por Houssay & Negrette (2).
2. *Houssay, B. A. & Negrette, J.* Acción hemolitica de algunos venenos de serpientes sulamericanos, *Rev. Asoc. Med. Argentina*, 35(216):1-31, 1922.
3. *Kitijima.* Cit. por Kraus & Werner (4).
4. *Kraus, R. & Werner, F.* Giftschlangen und die Serumbehandlung der Schlangenbisse. Jena, Gustav Fischer, 1931.
5. *Lacerda.* Cit. por Phisalix (9).
6. *Landsteiner, K.* Specificity of serological reactions, Charles C. Thomas, Springfield, Baltimore, 1936.
7. *Michel.* Cit. por Kraus & Werner (4).
8. *Noc, F.* Cit. por Houssay & Negrette (2).
9. *Phisalix, M.* Animaux venimeux et venins, Paris, Masson & Cie., 1922.
10. *Weir-Mitchell.* Cit. por Phisalix (9).

Mem. Inst. Butantan,
19 241-248, 1946.

UM NOVO LAGARTO DA ILHA DA QUEIMADA GRANDE

POR ALPHONSE R. HOGE

(Do Laboratório de Ofiologia e Zoologia Medica do Instituto Butantan, São Paulo, Brasil)

O material que serviu ao presente estudo foi capturado na Ilha da Queimada Grande durante uma expedição organizada pelo Instituto Butantan para colheita de espécimes zoológicos dessa área insular.

A Queimada Grande é uma ilhota rochosa, situada aproximadamente a 40 milhas a Sudoeste de Santos, tendo cerca de 1½ Km² de superfície.

Atualmente ela é deshabitada, e, apenas visitada, periodicamente, pelos encarregados do reabastecimento do farol automático aí existente, o qual é mantido pelo Ministério da Marinha.

Até o presente momento, são mencionados apenas dois répteis para esse local: *Bothrops insularis* Amaral e *Dipsas albifrons* (Sauvage).

Além da nova espécie de *Mabuya* que conseguimos capturar em número de três exemplares, notamos a existência de um *Hemidactylus* sp., do qual esperamos colher alguns numa próxima e já assentada excursão.

A espécie que descrevemos neste artigo parece existir abundantemente entre as pedras e matas mas, infelizmente, o mau tempo nos obrigou a embarcar precipitadamente, de volta antes que tivessemos recolhido mais exemplares.

Ordem S Q U A M A T A Oppel, 1811

Familia *SCINDAE* Gray, 1825

Mabuya macrorhyncha, sp. n.

Descrição: Focinho alongado e pontiagudo; pálpebra inferior com um disco transparente, não dividido; frenal anterior em contacto com a 2ª e 3ª labiais; supranasais não em contacto por trás da rostral; frontonasal tão longa quanto larga, em contacto com a frontal; prefrontais tão longas quanto largas, não em contacto por tras da frontonasal; frontal um pouco mais curta do que as frontoparietais e interparietal juntas, em contacto com a 2ª supraocular sòmente; 4 supraoculares; 5 supraciliares todas iguais; 2 frontaparietais largamente em contacto na linha mediana, mais ou menos iguais em tamanho à interparietal;

Recebido para publicação em 26 de setembro de 1946.

parietais em contacto por tras do interparietal; 2 pares nucais, o segundo dêstes porém às vêzes de contorno irregular; 7 supralabiais, 6ª geralmente maior; depressão auricular menor do que o olho: escamas dorsais lisas, em 28 filas, sendo as laterais um pouco menores; lamelas subdigitais lisas; cauda cerca de 1,1 vez mais longa do que o corpo mais a cabeça.

Coloração: Bronzeada em cima; uma lista lateral escura passando pelo olho e extendendo-se até a base da cauda, guarnecida por duas linhas claras marginais, sendo a inferior menos nítida.

A linha superior, por sua vez é orlada por uma lista escura que no meio do corpo é quase confluente com a do lado oposto.

Parte ventral cinzenta-oliva-clara.

Observações: Os três exemplares de *Mabuya macrorhyncha*, capturados na Queimada Grande distinguem-se à primeira vista das formas continentais, *Mabuya mabouya dorsivittata* Cope e *Mabuya mabouya mabouya* (Lacèpède), por terem o focinho muito mais alongado, pelo tamanho e relações das placas cefálicas e pelo colorido.

Eis um estudo comparativo entre *Mabuya mabouya dorsivittata* Cope e *Mabuya macrorhyncha.*

Consideramos:

C = comprimento rostro-anal

O = distância do canto anterior do olho até a extremidade do focinho

OF = distância do orifício auricular a extremidade do focinho

O estudo estatistico foi executado por meio de um diagrama de correlação entre duas medidas (O e C no primeiro caso e OF e C no segundo).

Foi calculada a linha de regressão e sôbre esta o erro de estimação

$$Sy = \sqrt{\frac{\Sigma D^2}{n - 2}}$$

Os dados referentes à nova espécie estão todos afastados da linha de regresão de mais de 3 x Sy.

Concluimos disto que o afastamento não é devido a uma variação casual.

Na figura 5 podemos ver que os valores de O são altamente significativos.

Na figura 6 está representada a relação OF/C que também é significativa.

Se tomamos os valores medios de O e C nas duas espècies e que fazemos a relação C/O obtemos um valor de 13,87 para *Mabuya mabouya dorsivittata* e de 10,69 para *Mabuya macrorhyncha.*

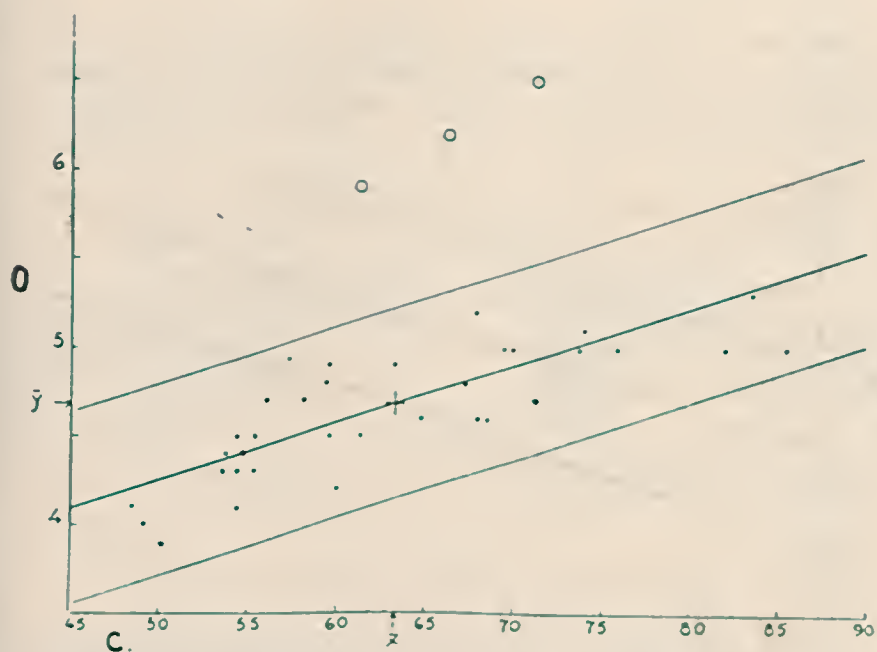



FIG. 5

Diagrama de correlação entre a distância do olho até a extremidade do focinho *O* e o comprimento rosto-anal *C*.

C — Comprimento rostro-anal em milimetros.
O — Distância do olho até a extremidade do focinho em milimetros.
• *Mabuya mabouya dorsivittata* Cope.
⊙ *Mabuya macrorhyncha.*

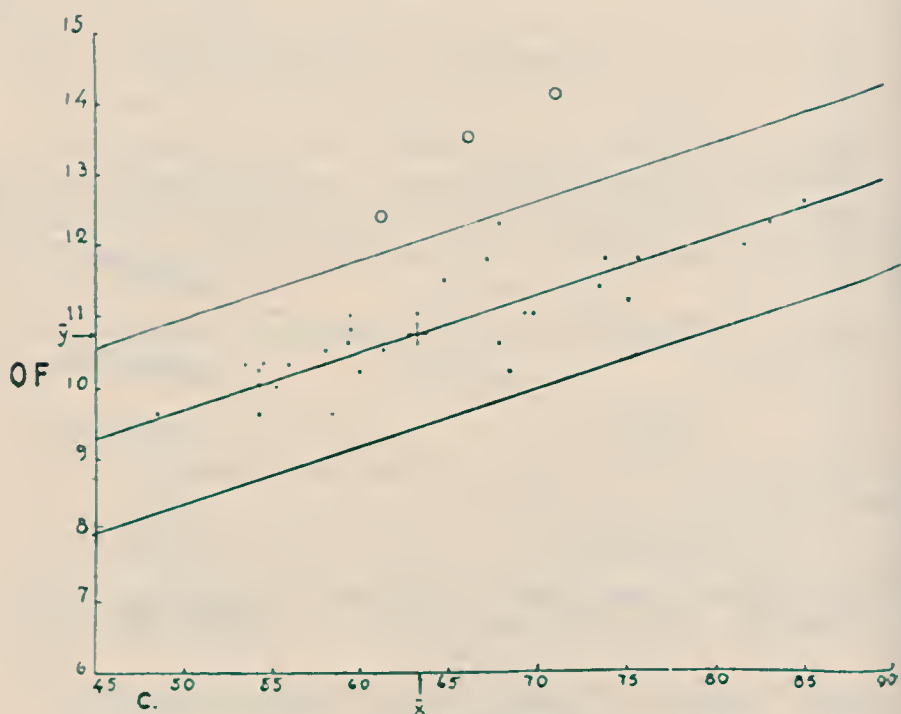



FIG. 6

Diagrama de correlação entre a distância da depressão auricular e a extremidade do focinho *OF* e o comprimento rostro-anal.

C — Comprimento rostro-anal em milimetros.

OF — Distância entre a depressão auricular e a extremidade do focinho em milimetros.

● *Mabuya mabouya dorsivittata* Cope.

○ *Mabuya macrorhyncha.*

Afim de se verificar se o alto valor de O não é devido ao facto de ter a *Mabuya macrorhyncha* uma cabeça maior, como poderia supor-se considerando-se que também o valor OF é significativamente mais alto na forma insular, fizemos a relação D/C sendo D = OF-O.

Os valores que obtivemos são praticamente iguais para as duas espécies, ficando pois claro que a diferença é devida ao maior comprimento do focinho (valor-O) na espécie insular, razão pela qual a denominamos *Mabuya macrorhyncha*.

Deixamos de fazer o estudo estatístico das outras medidas biométricas, o que reservaremos para uma futura revisão do gênero.

Damos em seguida um quadro comparativo de alguns caracteres verificados nas duas espécies.

	M. m. dorsovittata Cope	*Mabuya macrorhyncha*
Focinho	Curto e obtuso	Alongado e agudo
Supranasais .	Em contacto (excepcionalmente separadas)	Largamente separadas
Prefrontais ..	Mais largas do que longas	Tão longas quanto largas
Front nasal ..	Mais larga do que longa	Tão longa ou mais longa do que larga
Supraciliares .	Segunda maior	Iguais
Nucais	1 par	2 pares
Valor C/O ..	13,87	10,69
Valor C/OF .	5,8	4,2

Dimensões:

Tipo ♂ No. 758 na coleção do Instituto Butantan:

Comprimento total	153,3	mm
Comprimento rostro-anal	71,3	"
Comprimento da cabeça	13,73	"
Largura da cabeça	9,2	"
Comprimento da cauda	82,0	"
Membro posterior	24,0	"
Membro anterior	17,6	"

Paratipo ♂ No. 752

Comprimento total	135,4	mm
Comprimento rostro-anal	66,3	"
Comprimento da cabeça	13,4	"
Largura da cabeça	9,0	"
Comprimento da cauda	69,1	" (reconstituida)
Membro anterior	17,6	"
Membro posterior	23,6	"

♂ No. 760

Comprimento total	78.9	mm
Comprimento rostro-anal	61,3	"
Comprimento da cabeça	11,7	"
Largura da cabeça	7,9	"
Comprimento da cauda	17,6	" (mutilada)
Membro anterior	16,8	"
Membro posterior	20,7	"

Habitat: Ilha da Queimada Grande, ao largo da costa Sul do Estado de São Paulo, Brasil.

Data da captura: fevereiro de 1946 — (capturados por: A. Hoge).

ZUSAMMENFASSUNG

Beschreibung einer neuen Eidechsenart: *Mabuya macrorhyncha* die auf der Ilha Queimada Grande heimisch ist.

Die neue Mabuyaart unterscheidet sich von *Mabuya mabouya mabouya* (Lacépède) und *Mabuya mabouya dorsivittata* Cope durch folgende Merkmale: eine längere Schnautze; weit getrennte Supranasalia; Praefrontalia von gleicher Länge wie Breite; zwei Paar Nuchalia; verschiedene Färbung.

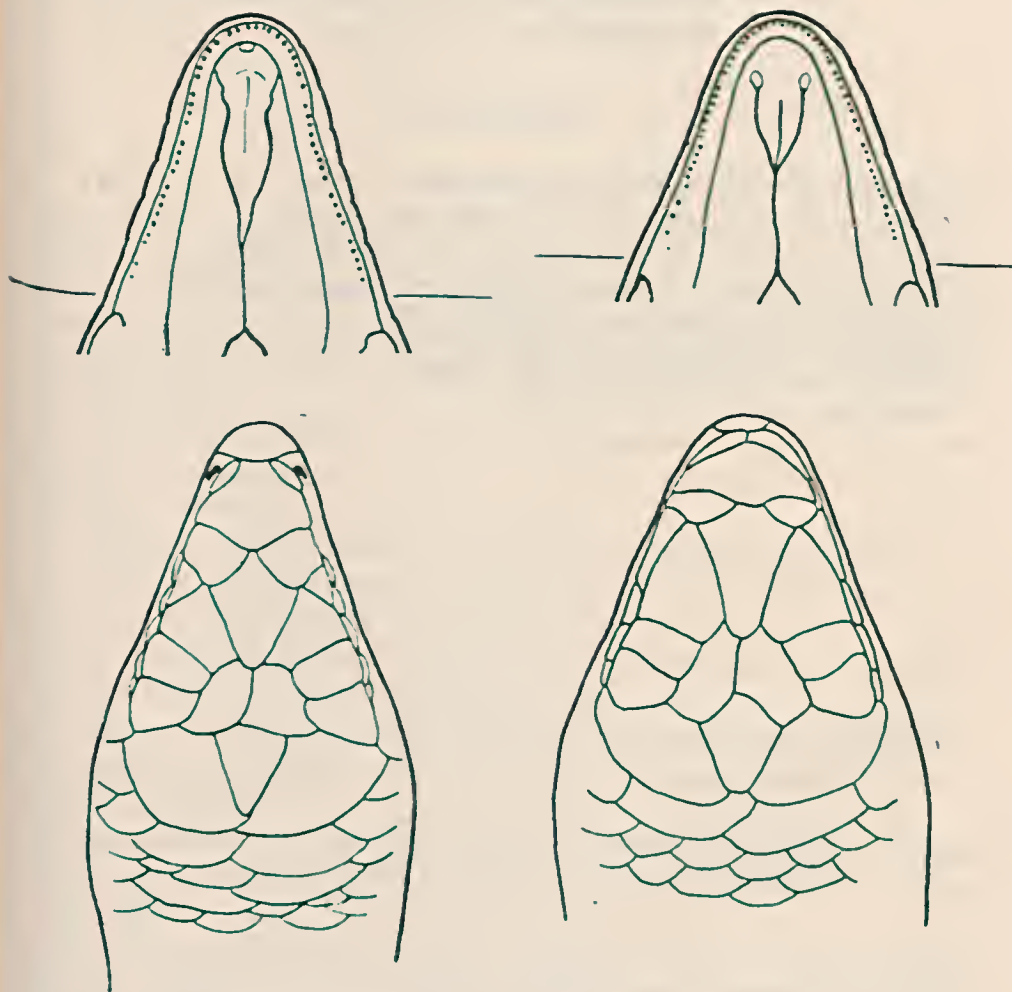
ABSTRACT

A new species of lizard is described: *Mabuya macrorhyncha* from the Queimada Grande Island near the coast of the State of São Paulo (Brazil).

The new *Mabuya* can be easily distinguished from *Mabuya mabouya mabouya* (Lacépède) and *Mabuya mabouya dorsivittata* Cope by: a longer snout; widely separated supranasals; prefrontals, as long as broad; frontonasal, as long or longer than broad; two pairs of nuchals; different coloration.

RESUMÉ

Description d'une nouvelle espèce de lézard: *Mabuya macrorhyncha* originaire de Ilha da Queimada Grande près de la Côte de l'Etat de São Paulo (Brésil).

La nouvelle espèce se distingue à premiere vue de *Mabuya mabouya mabouya* (Lacépède) par les caractéres suivants: museau plus allongé; supranasales largement séparées; préfronteaux aussi longs que larges; frontonasale aussi longue que large; deux paires de nucales; coloration différente.

Figs. 1-4
Comparação entre *Mabuya macrorhyncha* (à esquerda) com a espécie continental (à direita).

Agradecimentos: Desejamos consignar aqui os nossos agradecimentos ao diretor Prof. O. Bier, ao Dr. Alcides Prado, chefe da Secção de Ofiologia onde foi realizado o presente trabalho e ao Dr. Ayrton Gonçalvez, diretor da Escola de Pesca de Santos, que colocou um barco à nossa disposição para a expedição à ilha da Queimada Grande.

BIBLIOGRAFIA

1. *Amaral, A. do.* Mem. Inst. Butantan, **9**:245, 1935.
2. *Amaral, A. do.* Mem. Inst. Butantan, **11**:203, 1937.
3. *Boulenger, G. A.* Cat. Liz. British Museum, Vol. 3:190-192, 1887.
4. *Burt, C. E. & Burt, M. D.* Trans. Acad. Sc. Soc. S. Louis, **28**:86, 1933.
5. *Cope, E. D.* Proc. Acad. Nat. Sc. Philad., **9**, 1862.
6. *Dunn E. R.* Proc. Acad. Nat. Sc. Philad., **87**:547, 1935.
7. *Lacépède.* Hist. Nat. Quadr. Ovip., Vol. 2, 1788.
8. *Raddi.* Mem. Soc. Ital. Modena, **19**, 1823.

Mem. Inst. Butantan.
19:249-372, 1946.

PRONOCEPHALIDAE (*TREMATODA*). ESTUDOS DAS ESPÉCIES BRASILEIRAS E REVISÃO DA FAMÍLIA.

POR JOSÉ MANOEL RUIZ

(Do Laboratório de Zoologia e Parasitologia da Faculdade de Farmácia e Odontologia da Universidade de São Paulo. São Paulo, Brasil)

Looss, em 1899, creou a subfamília PRONOCEPHALINAE para incluir três novos gêneros de monostomideos parasitos de tartarugas marinhas: *Pronocephalus*, *Cricocephalus* e *Pyclosomum*.

Em 1901 adiciona quatro novos gêneros, tambem de espécies parasitas de tartarugas, a saber: *Charaxicephalus*, *Adenogaster*, *Pleurogonius* e *Glyphicephalus*.

Em 1902, eleva PRONOCEPHALINAE à categoria de família e acrescenta o gênero *Epibathra*.

Linton, em 1910, descreve duas espécies parasitas de *Caretta caretta*, para as quais estabelece dois novos gêneros: *Barisomum*, tipo *erubescens* e *Himasomum*, tipo *candibulum*.

Stephens, em 1911, descreve o gênero *Desmogonius*, tipo *desmogonius* n. sp..

Johnston, em 1913, redescreve a espécie *Monostomum pandum* Braun, 1901 que coloca no gênero *Diaschistorchis* Johnston, 1913.

Pratt, em 1914, descreve um novo gênero, *Wilderia* para uma espécie encontrada em *Caretta caretta*, *W. elliptica*.

Barker, em 1922 descreve um novo gênero de pronocefalideo, *Synechorchis*, tipo *megas*, que considera muito próxima de *Monostomum pandum* Braun, e *Wilderia elliptica* Pratt.

Travassos, em 1922 propõe o gênero *Hippocrepis* para incluir a espécie *Monostomum hippocrepis* Diesing, 1855, que inclui na família *Notocotylidae* Luehe, 1909.

Poche, em 1925, transfere o gênero *Hippocrepis* para a família PRONOCEPHALIDAE e descreve um novo gênero, *Astrorchis*, para a espécie *Monostomum renicapite* Leidy.

Em 1929, Fukui, em seu estudo sobre os paranfistomideos, cria o gênero *Opisthoporus* e a família OPISTHOPORIDAE, para a espécie *Paramphistomum aspidonectes* MacCallum, 1917.

Em 1930, Stunkard faz vêr que *Opisthoporus aspidonectes* (MacCallum) não é um paranfistomideo, o que já havia sido aventado por Poche em 1925, e mostra as suas relações filogenéticas com os PRONOCEPHALIDAE.

Mackin, em 1930, cria o gênero *Macravestibulum*, espécie tipo, *M. obtusicaudum*.

Price foi o primeiro, depois de Looss, a fazer um estudo de conjunto de PRONOCEPHALIDAE. Em 1931 publica seu trabalho no qual sobressaem os seguintes fatos: inclui o gênero *Opisthoporus* que coloca numa nova subfamília, OPISTHOPORINAE; crêa a subfamília CHARAXICEPHALINAE para incluir os gêneros *Charaxicephalus* Loos e *Desmogonius* Stephens; identifica os gêneros *Symcchorchis* Barker, *Wilderia* Pratt e *Diaschistorchis* Johnston, e o gênero *Himasomum* Linton e *Barisomum* Linton; reconsidera o gênero *Hippocrepis* que inclui em NOTOCOTYLIDAE.

Em resumo, é a seguinte a classificação apresentada por Price:

Fam. PRONOCEPHALIDAE Looss, 1902.

Subfam. OPISTHOPORINAE n. subfam.

Gên. *Opisthoporus* Fukui, 1929.

Subfam. CHARAXICEPHALINAE n. subfam.

Gên. *Charaxicephalus* Looss, 1901.

Desmogonius Stephens, 1911.

Subfam. PRONOCEPHALINAE Looss, 1899.

Gên. *Pronocephalus* Looss, 1899.

Diaschistorchis Johnston, 1913.

Cricocephalus Looss, 1899.

Pleurogonius Looss, 1901.

Adenogaster Looss, 1901.

Pyelosomum Looss, 1899.

Astrorchis Poche, 1925.

Epibathra Looss, 1902.

Glyphicephalus Looss, 1901.

Mehra, em 1932a., descreve um novo gênero, *Neopronocephalus*, espécie tipo *N. triangularis* que coloca numa nova sufamília, NEOPRONOCEPHALINAE. Desconhecendo o trabalho de Price e os dois primeiros de Looss, apresenta uma classificação na qual a subfamília PRONOCEPHALIDAE era dividida em três subfamílias:

Subfam. NEOPRONOCEPHALINAE.

Gên. *Neopronocephalus*.

Subfam. CHARAXICEPHALINAE.
Gên. *Charaxicephalus* Looss, 1902.
Diaschistorchis Johnston, 1913.
Desmogonius Stephens, 1911.

Subfam. PRONOCEPHALINAE.
Gên. *Pronocephalus* Looss, 1902.
Cricocephalus Looss, 1902.
Epibathra Looss, 1902.
Adenogaster Looss, 1902.
Glyphicephalus Looss, 1902.
Pleurogonius Looss, 1902.
Macravestibulum Mackin, 1930.

Alguns meses depois, Mehra retoma o assunto combinando sua antiga classificação à de Price: aceita a subfamília OPISTHOPORINAE e adiciona uma nova subfamília, HIPPOCREPINAE; apresenta então uma revisão mais criteriosa do assunto resumível da seguinte forma :

Fam. PRONOCEPHALIDAE Looss, 1902.
Subfam. OPISTHOPORINAE Price, 1931.
Gên. *Opisthoporus* Fukui, 1929.
Subfam. HIPPOCREPINAE.
Gên. *Hippocrepis* Travassos, 1922.
Subfam. CHARAXICEPHALINAE Price, 1931.
Gên. *Charaxicephalus* Looss, 1901.
Dischistorchis Johnston, 1911.
Desmogonius Stephens, 1911.
Subfam. NEOPRONOCEPHALINAE Mehra, 1932.
Gên. *Neopronocephalus* Mehra, 1932.
Subfam. PRONOCEPHALINAE Looss, 1899.
Gên. *Pronocephalus* Looss, 1899.
Cricocephalus Looss, 1899.
Pyelosomum Looss, 1899.
Adenogaster Looss, 1901.
Pleurogonius Looss, 1901.
Glyphicephalus Looss, 1901.
Epibathra Looss, 1902.
Barisomum Linton, 1910 (= Himasomum Linton, 1910).
Astrorchis Poche, 1925.
Macravestibulum Mackin, 1930.

Os gêneros *Epibathra* Looss, 1902, *Astrorchis* Poche, 1925 e *Myosacc...s* Gilbert, 1938, são considerados sinônimos de *Pyelosomum* Looss, 1899 emend.

O gênero *Cochleotrema* Travassos & Vogelsang, 1931, considerado na sinonimia de *Opisthotrema* Fischer, 1883 por Price (1932), é revalidado.

O gênero *Cymbiforma* Yamaguti, 1933, mencionado em nosso trabalho anterior como duvidoso, é aqui considerado sinônimo de *Ogmocotyle* Skrjabin & Schulz, 1933.

O gênero *Medioporus* estabelecido por Oguro em 1936, é considerado idêntico a *Pleurogonius* Looss, 1901, levando em conta que a posição do poro genital não constitue, no caso, elemento diferencial genérico; para este gênero aceitamos os termos diagnosticos propostos por Mehra em 1939, com algumas modificações.

. . . .

No intuito de facilitar futuras pesquizas neste grupo, com referência ao material brasileiro, fazemos uma revisão de todas as espécies. Do material à nossa disposição fazemos uma descrição, ou melhor redescrição, segundo nossa observação propria e dos demais reproduzimos as descrições originais dos respectivos autores. Constitui esta a primeira parte do nosso trabalho.

Na segunda parte apresentamos uma revisão geral da família PRONOCEPHALIDAE com a diagnose de todas as subfamílias e gêneros. De cada gênero reproduzimos um desenho, eventualmente mais de um, da espécie tipo, e enumeramos, sinópticamente, todas as espécies nele consideradas.

Aceitamos atualmente a seguinte classificação:

Classe: **TREMATODA** Rudolphi, 1808.
Sub-classe: **DIGENEA** v. Beneden, 1858.
Ordem: **PROSOSTOMATA** Odhner, 1905.
Sub-ordem: MONOSTOMATA Zeder, 1800.
Superfamília: PRONOCEPHALOIDEA n. nom. (1)
Família: PRONOCEPHALIDAE Looss, 1902, emend.
Subfamília: PRONOCEPHALINAE Looss, 1899 emend.
Gên. *Pronocephalus* Looss, 1899.
Criocephalus Looss, 1899.
Pyelosomum Looss, 1899.
Adenogaster Looss, 1901.
Pleurogonius Looss, 1901 emend.
Teloporia Fukui, 1933.
Iguanacola Gilbert, 1938.
Renigonius Mehra, 1939.

---

(1) Damos a esta superfamília o senso de *NOTOCOTYLIDA* Poche, 1925, ou NOTOCOTYLOIDEA Price, 1932.

Subfamília: NOTOCOTYLINAE Kossack, 1911 emend.
Gên. *Notocotylus* Diesing, 1839.
Ogmogaster Jägerskiöld, 1891.
Catatropis Odhner, 1905.
Paramonostomum Luehe, 1909.
Ogmocotyle Skrjabin & Schulz, 1933.
Quinqueserialis Skvortsov, 1935 emend.
Hofmonostomum Harwood, 1939.

Subfamília: NUDACOTYLINAE Barker, 1916.
Gên. *Nudacotyle* Barker, 1916.
Neocotyle Travassos, 1922.

Subfamília: CHARAXICEPHALINAE Price, 1931.
Gên. *Charaxicephalus* Looss, 1901.
Desmogonius Stephens, 1911.
Diaschistorchis Johnston, 1913.

Subfamília: NEOPRONOCEPHALINAE Mehra, 1932.
Gên. *Neopronocephalus* Mehra, 1932 emend.

Subfamília: OPISTHOTREMATINAE Harwood, 1939.
Gên. *Opisthotrema* Fischer, 1883.
Pulmonicola Poche, 1935.
Cochleotrema Travassos & Vogelsang, 1931.

Subfamília: CHOANOPHORINAE Caballero, 1942.
Gên. *Choanophorus* Caballero, 1942.
Macravestibulum Mackin, 1930 emend.
Metacetabulum Freitas & Lent, 1938 emend.
Cetiosaccus Gilbert, 1938 emend.

ESTUDO DAS ESPECIES BRASILEIRAS

A primeira espécie da família PRONOCEPHALIDAE referida no Brasil, *Pleurogonius trigonocephalus*, foi descrita por Rudolphi, em 1809, sob o nome *Monostoma trigonocephalus*, de material europeu. A descrição de Rudolphi, muito sumária e destituida de ilustrações, deu origem a certas confusões na identificação posterior desta espécie, conforme se verifica através da literatura antiga. Esse estado confuso foi devidamente esclarecido por Braun que examinou os ainda existentes originais de Rudolphi. Em 1901, Braun redescreve *Monostomum trigonocephalum* e dá uma bôa figura.

Em 1902, Looss apresenta uma nova descrição da espécie que enquadra no gênero *Pleurogonius*. As descrições e figuras desses autores são concordes.

Não resta duvida pois, que a espécie descrita por Rudolphi seja *Pleurogonius trigonocephalus*.

Diesing, em 1850 refere *M. trigonocephalum* em material brasileiro levado para a Europa por Natterer "...in Brasilia vario anni tempore (Natterer). M. C. V.". Como Diesing considerasse na sinonímia desta espécie *Monostomum album* (atual *Cricocephalus albus*), e *Monostomum rubrum* (= *Cricocephalus ruber*), não podemos afirmar ao certo a qual das espécies corresponde a referida no Brasil. Tal dúvida deixa de existir porque Braun, em 1901, tambem menciona o seu encontro, no Museu de Viena, material de *Chelone mydas* proveniente do Brasil: "...ich habe sie ferner konstatiert in der Wiener Sammlung (aus *Chelone mydas*, Brasilien; IV. 38)".

A segunda espécie referida no Brasil, *Paramonostomum ionorne*, foi descrita por Travassos em 1921.

Em 1922 Travassos estabelece o gênero *Neocotyle*, tipo *N. neocotyle* n. sp. e descreve *Nudacotyle valdevaginatus* n. sp., ambas formas parasitas de *Hydrochoerus capybara* proveniente de Mato Grosso e, em 1939, acrescenta ao gênero *Nudacotyle* a espécie *N. tertius*, do mesmo hospedeiro, proveniente do Estado do Rio.

Freitas e Lent, em 1938 descrevem um novo gênero, *Metacetabulum*, esp. tipo M. INVAGINATUM parasito intestinal de *Chelone mydas* capturado em Rio de Janeiro. Esse gênero foi originariamente incluido numa nova família entre os PARAMPHISTOMOIDEA. No presente trabalho mostramos as afinidades de *M. invaginatum* e outras espécies incluidas na família PRONOCEPHALIDAE. Deste modo eleva-se a seis o número de espécies desta família constatadas em nosso país. Aqui apresentamos a observação de diversas outras espécies, uma das quais nova.

Este trabalho foi realisado com material das coleções helmintológicas do Instituto Butantan e, principalmente, do Instituto Oswaldo Cruz. Do primeiro dispuzemos de 4 lotes, todos provenientes de uma única necrópsia (necr. n.º 2.127 de 4/12/1939), de uma tartaruga proveniente de Santos (Práia Grande) cuja identificação genérica ou específica não foi feita naquela ocasião; encontramos o material em parte montado, a maioria conservado em formol-acético num único frasco. Alem de trematoides de outros grupos, encontramos aí cerca de uma centena de exemplares de *Metacetabulum invaginatum*, 7 exemplares de *Pronocephalus trigonocephalus* (= *P. obliquus*), 5 exemplares que identificamos a *Pleurogonius linearis* e 2 exemplares de uma espécie que descrevemos como nóva, *Pronocephalus minutus*.

Do Instituto Oswaldo Cruz foi posto à nossa disposição um número apreciavel de lotes, a maior parte dêles já montados em laminas, que passamos a enumerar com as respectivas indicações:

9767 — *Chelone mydas* (L.), Estômago, Rio de Janeiro, D. F., Lent & Freitas col., 23-9-1937. Necrópsia 5815.

9768 — *Chelone mydas* (L.), Estômago, Rio de Janeiro, Travassos col., 8-1-1923. Necrópsia 2048.

9769 — *Chelone mydas* (L.), Estômago, Rio de Janeiro, Travassos col., 8-1-1923. Necrópsia 2048.

9770 — *Chelone mydas* (L.), Intestino, Rio de Janeiro, Travassos col., ?

9772 — *Chelone mydas* (L.), Intestino grosso, Rio de Janeiro, Travassos col., 8-1-1923. Necrópsia 2048.

9773 — *Chelone mydas* (L.), Estômago, Rio de Janeiro, Travassos col., ?

9774 — *Chelone mydas* (L.), Estômago, Rio de Janeiro, Travassos col., ?

9775 — *Chelone mydas* (L.), Duodeno, Rio de Janeiro, Travassos col., 11-1932. Necrópsia 5239.

9777 — *Chelone mydas* (L.), Duodeno, Rio de Janeiro, Travassos col., 11-1932. Necrópsia 5239.

9794 — *Chelone mydas* (L.), Intestino delgado, Rio de Janeiro, Lent & Freitas col., 23-9-1937. Necrópsia 5815.

9888 — *Chelone mydas* (L.), Intestino delgado, Rio Estrela, Rio de Janeiro, Lent & Freitas col., 23-9-1937.

9941 — *Chelone mydas* (L.), Estômago, Rio Estrela, Rio de Janeiro, Lent & Freitas col., 23-9-1937.

10277 — *Chelone mydas* (L.), Intestino, Rio de Janeiro, Travassos col., 8-1-1923. Necrópsia 2048.

10278 — *Chelone mydas* (L.), Estômago, Rio de Janeiro, Travassos col., 8-1-1923. Necrópsio 2048.

Deixamos consignados aqui os nossos agradecimentos, não só pelo franqueamento dos laboratórios e o fornecimento de material helmintológico, mas tambem pelas facilidades que nos concederam sob multiplos aspectos, aos Drs. Lauro Travassos, Herman Lent e J. F. Teixeira de Freitas, do Instituto Oswaldo Cruz, e Flavio da Fonseca, do Instituto Butantan. Somos grato ao Dr. Paulo de Toledo Artigas, que sempre foi para nós um incentivador, aos amigos Aristoteris T. Leão e Astolpho S. Grotta pela ajuda que nos dispensaram nas questões de microtécnica. As consultas bibliográficas muito foram favorecidas graças à dedicação e bôa vontade dos Drs. Lauro Travassos Filho, Clemente Pereira, Zeferino Vaz e Carlos de Toledo Fleury, aos quais expressamos o nosso reconhecimento.

I — Subfamilia PRONOCEPHALINAE Looss. 1899.

A — Gênero *Pronocephalus* Looss. 1899.

1 — *Pronocephalus trigonocephalus* Looss. 1899

(figs. 1-4, 7-11, 15-16, 22, 29)

Descrição: Corpo alongado, de largura variavel com a região: extremidade anterior lanceolar opresentando um colar cefálico bem evidente, interrompido na face ventral por uma depressão em forma de V invertido; na zona bifurcal o corpo se estreita, dando a idéia de um pescoço, para depois alargar-se progressivamente para trás, atingindo o máximo na metade posterior; a extremidade posterior é arredondada. Cuticula inerme. Ventosa oral bem desenvolvida, de contorno circular. Ventosa ventral ausente. Esôfago delgado, medianamente longo. Faringe ausente. Cecos delgados, pouco sinuosos, atingindo as proximidades da extremidade posterior do corpo, terminando em convergência para a linha mediana, ao nivel do poro excretor. Poro genital situado, mais ou menos, no limite dos quartos anteriores do corpo, um tanto desviado da linha mediana para o lado esquerdo. Bolsa do cirro muito desenvolvida, apresentando um grosso envoltorio muscular, situada na metade anterior do corpo; apresenta uma parte basal muito dilatada, correspondente à porção prostática, sendo a distal mais delgada, em geral um tanto recurvada, em forma de C; esta parte contem um ducto ejaculador e um cirro musculoso, tortuoso, geralmente desenvaginado. A vesicula seminal é constituida por um longo tubo enovelado que se encontra livre no parênquima, para trás da bolsa do cirro. Testiculos de cotorno liso ou ligeiramente irregular, situados no quarto posterior do corpo em posição inclinada; são em geral intracecais podendo, nos exemplares mais velhos, atingir os campos cecais que às veses ultrapassam. Ovário, arredondado ou ligeiramente irregular, situado imediatamente acima da zona testicular, à direita da linha mediana, intracecal. Glândula de Mehlis situada imediatamente atrás do ovário. Não observamos o canal de Laurer. Espermatéca ausente. Vitelinos dispostos em dois grupos laterais de acnes numerosos que se extendem desde a zona testicular até as proximidades da linha equatorial. Útero formando numerosas alças que se extendem desde a zona ovariana até a base da bolsa do cirro, em geral intracecais. Vagina tubular, muito musculosa e envolta por células glandulares, menor que a bolsa do cirro, situada à esqureda da linha mediana. Ovos muito numerosos, elipsóides, de casca relativamente espessa, apresentando um longo filamento em cada polo. Póro excretor situado na linha mediana, proximo da extremidade posterior, circundado por um esfincter muito evidente. Vesícula excretora volumosa, extendendo-se até as proximida-

tes da glândula de Mehlis, passando entre os testículos, onde se bifurca em forma de Y; os canais coletores margeiam os campos cecais pelo lado externo e atingem superiormente a altura da ventosa oral onde terminam em fundo cégo.

Trabalhamos com o seguinte material:

7 exemplares do intestino de tartaruga marinha (sp?), Santos, Flavio da Fonseca col. Necrópsia 2127, 4-12-1939. Coleção do Instituto Butantan.

1 exemplar do estômago de *Chelone mydas*, Rio de Janeiro, Travassos col., Necrópsia 2048. 8-1-1923. Coleção do Instituto Oswaldo Cruz, N°. 9769.

2 exemplares do duodeno de *Chelone mydas*, Rio de Janeiro, Travassos col. Necrópsia 5239. 11-1-1932. Coleção do Instituto Oswaldo Cruz, N°. 9775.

Damos um quadro com medidas de 10 exemplares, expressas em mm. Os 5 primeiros exemplares são da coleção do Inst. Butatan e os demais do Inst. Oswaldo Cruz (lam. N°. 9775).

Comprimento	5,65	5,72	4,38	5,84	5,23	5,63	3,87	3,75	3,25	3,50
Largura	1,34	1,62	1,20	1,69	1,48	1,43	1,34	1,40	1,12	1,09
Ventosa oral (diâmetro)	0,197	—	0,183	0,240	0,212	0,186	0,172	0,172	0,157	0,157
Esôfago	0,424	0,353	0,252	0,381	0,282	0,500	0,356	0,329	0,357	0,400
Test. anterior (diâmetro)	0,551	0,565	[illegible]	0,565	0,46	0,526	0,447	0,421	—	0,368
Test. posterior (diâmetro)	0,523	0,565	0,367	0,474	0,424	[illegible]	0,368	0,447	0,368	0,342
Bolsa do cirro (comprimento)	1,343	1,414	[illegible]	1,414	1,343	1,490	1,000	1,119	0,894	0,867
Bolsa do cirro (largura)	0,410	0,395	0,381	0,381	0,424	0,289	0,210	0,210	0,158	0,158
Ovário (diâmetro)	0,296	0,331	0,183	0,339	0,311	0,302	0,237	0,263	0,237	0,197
Vagina (compr.)	0,777	0,848	0,636	0,848	0,848	0,657	0,526	0,447	0,473	0,526
Vagina (larg.)	0,141	0,197	0,141	0,197	0,159	0,131	0,079	0,105	0,079	0,079
Distância entre a bifurcação cecal e o poro genital	0,636	0,474	0,636	0,777	0,565	[illegible]	0,526	0,657	0,526	0,361
Dimensões dos ovos	0,019 a [illegible]21 mm de comprimento 0,012 a [illegible] mm de largura (filamento 0,28 a 0,35 mm de compr.)					0,[illegible] a 0,[illegible]24 mm de comprimento 0,011 a 0,013 mm de largura (filamentos não medidos)				

2 — *Pronocephalus minutus* sp. n.

(figs. 12, 13, 14)

Descrição: Corpo pequeno com a extremidade anterior lanceolar e a posterior arredondada; colar cefálico muito amplo apresentando, na face dorsal, uma depressão em forma de *V* invertido e outra, mais profunda, na face ventral. Ventosa oral subterminal, com a abertura voltada para a face ventral. Faringe ausente. Esôfago delgado, de comprimento médio. Cecos simples, ex-

tendendo-se para trás, através do campo uterino, e terminando imediatamente atrás dos testiculos. Poro genital situado no terço anterior do corpo, à esquerda da linha mediana, intracecal, medindo 0,028 mm de diâmetro. Bolsa do cirro volumosa, de contorno quasi ovóide, envolta por uma camada muscular delicada; contem um cirro curto, tubular, e uma parte prostática envolta por um tecido glandular compacto que enche toda a cavidade da bolsa. Vesícula seminal tubular e externa. Testiculos volumosos, de contorno quasi liso, intracecais e levemente extracecais, situados no terço posterior do corpo, com zonas coincidentes e campos contiguos. Ovário sub-esférico, situado no terço médio do corpo, à direita da linha mediana, acima da zona dos vitelinos. Complexo da glândula da casca não observado. Vietlinos constituidos por dois grupos de foliculos muito volumosos e relativamente pouco numerosos, dispostos nas margens do corpo entre as zonas testicular e ovariana. Útero formando alças amplas que se extendem para baixo da zona ovariana, atingindo a testicular e depois se dirigem para a frente, chegando a ultrapassar o limite basal da bolsa do cirro. Vagina muito pequena, à esquerda da bolsa do cirro. Ovos numerosos, elipsóides, de casca delgada e apresentando um filamento delicado em cada polo; o comprimento dos filamentos não foi determinado. Poro excretor mediano e terminal, medindo cerca de 0,030 mm d diâmtro. A parte correspondente à vesicula excretora, no material examinado, corado pelo carmim, se apresenta como uma formação escura bem delimitada situada entre a zona testicular e a extremidade posterior do corpo; os detalhes exatos não foram entretanto observados.

Habitat: Intestino de "tartaruga marinha".

Proveniencia: Práia Grande, Santos, Estado de São Paulo.

Medidas: Exemplar tipo:

Comprimento 2,565 mm. Largura 1,032 mm. Diâmetro da ventosa oral 0,155 mm. Esôfago 0,183 mm. Testiculo direito 0,395 mm de comprimento por 0,353 mm de largura. Testiculo esquerdo 0,353 mm de comprimento por 0,311 mm de largura. Bolsa do cirro 0,353 mm de comprimento por 0,212 mm de largura. Ovário 0,212 mm de diâmetro transverso. Diâmetro dos foliculos vitelinicos 0,07 a 0,113 mm. Vagina 0,126 mm de comprimento por 0,047 mm de largura. Ovos, sem os filamentos, 0,014 a 0,019 mm de comprimento por 0,011 mm de largura.

Exemplar parátipo:

Comprimento 2,686 mm. Largura 0,989 mm. Diâmetro da ventosa oral 0,155 mm. Esôfago 0,240 mm. Testiculo direito 0,541 de comprimento por 0,422 mm de largura. Testiculo esquerdo 0,541 mm de comprimento por 0,305 de largura. Bolsa do cirro 0,325 mm de comprimento por 0,226 mm de lar-

gura. Ovário 0,252 mm de diâmetro. Diâmetro dos foliculos vitelinicos 0,070 a 0,141 mm. Ovos 0,014 a 0,015 mm de comprimento por 0,011 mm de largura.

A presente descrição é baseada em dois exemplares, comprimidos e montados *in toto*. O material é proveniente da necrópsia Nº. 2127 de 4-12-1939 da secção de parasitologia do Instituto Butantan, em cuja coleção se acha depositado.

Pronocephalus minutus sp. n. constitue a segunda espécie do gênero e diferencia-se da espécie tipo, *P. trigonocephalus* por uma série de caracteres: morfologia e extensão do colar cefálico, posição dos testiculos, comprimento dos cecos, posição do ovário, diâmetro e extensão dos policulos vitelínicos, forma e tamanho da bolsa do cirro, extensão das alças uterinas, tamanho dos ovos e situação do poro excretor.

B — Gênero *Cricocephalus* Looss, 1899

3 — *Cricocephalus albus* (Kuhl et Hasselt, 1822) Looss, 1899

(figs. 20, 21, 25)

Descrição: Corpo alongado; extremidade anterior atenuada, lanceolar, e a posterior alargada e ligeiramente truncada, apresentando duas saliências mamilosas terminais, situadas simétricamente, uma em cada lado do corpo. Colar cefálico bem evidente. Cuticula lisa. Ventosa oral subterminal, circular, voltada para a face ventral. Faringe ausente. Esôfago curto, simples e delgado. Cecos longos, paralelos, passando entre os testículos e terminando nas proximidades da extremidade posterior do corpo; apresentam numerosas ramificações laterais externas ao longo de todo o percurso. Poro genital situado nas proximidades da bifurcação cecal ligeiramente desviado da linha mediana para a esquerda. Bolsa do cirro muito desenvolvida com um comprimento que se aproxima à metade do comprimento total do corpo; dirigida verticalmente e com a base no nivel da região equatorial, na região mediana do corpo, apresenta uma porção basal muito dilatada, que corresponde à parte prostática, a seguir observa-se uma constricção muito acentuada que dá a uma porção tubular delgada quasi tão longa quanto a parte prostática; esta corresponde ao ducto ejaculador que se prolonga para a frente; na parte distal a bolsa dilata-se novamente e encerra um cirro musculoso atrás do qual existem numerosas células glandulares. A vesicula seminal é constituida por um grosso tubo, situado fóra da bolsa do cirro, que se dirige para trás ao longo da linha mediana do corpo e atinge o

nivel da zona ovariana. Testículos ligeiramente lobados, situados na extremidade posterior do corpo em campos afastados e zonas coincidentes. Ovário ligeiramente lobado, menor que os testículos, à direita da linha mediana, intracecal, imediatamente pretesticular. Complexo da glândula da casca postovariano, na linha mediana do corpo. Vagina muito desenvolvida e musculosa, menor que a bolsa do cirro, paralela a esta e de morfologia característica: apresenta cerca da metade basal muito dilatada envolta por uma camada glandular muito fina; a porção distal é tubular e muito mais delgada sendo envolta por uma camada de células glandulares muito grandes; as extremidades desta porção apresentam uma dilatação musculosa sub-esférica que fazem saliência para os lados. Útero muito circunvoluido, disseminado desde a base da vagina até a zona ovariana, formando numerosas alças horizontais, intra e extracecais. Ovos numerosos, elipsóides, apresentando um longo filamento em cada polo. Vitelinos constituidos de foliculos grandes, não muito numerosos e distribuidos em dois grupos pretesticulares, nos campos laterais.

Trabalhamos com os seguintes lotes desta espécie:

2 exemplares — *Chelone mydas*, estômago, Rio de Janeiro, D. F., Lent & Freitas col., 23-9-1937. Necrópsia 5815. Lam. 9767 da Coleção do Instituto Oswaldo Cruz.

8 exemplares — *Chelone mydas*, estômago, Rio de Janeiro, Travassos col., 8-1-1923. Necrópsia 2048. Lam. 9768 do Inst. Oswaldo Cruz.

3 exemplares — *Chelone mydas*, estômago, Rio de Janeiro, Travassos col. Lam. 9773 do Inst. Oswaldo Cruz.

10 exemplares — *Chelone mydas*, estômago, Rio de Janeiro, Travassos col. Lam. 9774 do Inst. Oswaldo Cruz.

3 exemplares — *Chelone mydas*, duodeno, Rio de Janeiro, Travassos col., 11-1932. Necrópsia 5239. Lam. 9777 do Inst. Oswaldo Cruz.

1 exemplar — *Chelone mydas*, intestino delgado, Rio de Janeiro, Lent & Freitas col., 23-9-1937. Necrópsia 5815. Tubo 9794 do Inst. Oswaldo Cruz.

2 exemplares — *Chelone mydas*, intestino, Rio de Janeiro, Travassos col., 8-1-1923. Necrópsia 2048. Lam. 10277 do Inst. Oswaldo Cruz.

24 exemplares — *Chelone mydas*, estômago, Rio de Janeiro, Travassos col., 8-1-1923. Necrópsia 2048. Lam. 10278 do Inst. Oswaldo Cruz.

Damos a seguir um quadro de medidas de alguns exemplares desta espécie, expressas em mm.

Comprimento	6.47	6.49	6.42	5.92	5,42	[illegible],81	6,63	5,31
Largura	2.05	2.09	1,87	1,73	1,79	1,92	1,86	1,34
Ventosa oral (diâmetro)	0.515	0.515	0.558	0.5[illegible]	0.486	0.515	0.515	0.458
Esôfago (comprimento)	0.343	0.343	0.372	0,286	0.214	0.357	0,315	0.286
Bolsa do cirro (compr. total)	2,977	2.950	2,788	2.517	2,344	2,746	2,974	1,831
Parte prostática (compr.) ...	0.858	1,144	[illegible],786	[illegible],715	0,858	[illegible],887	1,044	0,615
Parte prostática (largura) .	0,315	0,315	[illegible],315	0.315	0,243	0,243	0,257	0,172
Testiculos	0.458	0,472	0,515	0,429	[illegible]	0,529	0,631	0,400
(diâm. transv.) ...	0,486	0,429	[illegible]	0,429	[illegible],443	0,472	0,515	0,499
Ovário (diâmetro)	0,329	0,286	0.329	0,329	0,286	0,343	0,315	0,229
Vagina (comprimento)	2,[illegible]	2,216	1,145	1,858	1,644	1,501	1,644	1,215
Vagina (larg. máxima)	0,315	0,214	0,272	0,272	0,3[illegible]0	0,243	0,243	0,186
Dimensões dos ovos	Media: [illegible] de comprimento × 0,012 mm de largura. Variações: 0,024 a 0,[illegible]28 mm de comprimento × 0,011 a 0,013 mm de largura. Os filamentos não foram medidos.							

C — Gênero *Pyelosomum* Looss, 1899 emend.

4 — *Pyelosomum crassum* (Looss, 1901) n. comb.

(figs. 17, 18)

Descrição: Corpo alongado com a extremidade posterior arredondada e a anterior mais atenuada e apresentando um nítido colar cefálico com uma fraca depressão na face ventral. Cuticula lisa. Ventosa oral subterminal, de contorno circular. Faringe ausente. Esôfago delgado. Cecos largos e ligeiramente sinuosos, extendendo-se, não muito distantes das margens do corpo, até a extremidade posterior, ultrapassando a zona testicular ao nivel da qual se aproximam com tendência a situarem-se para dentro dos testiculos; não são, entretanto, intratesticulares mas testiculares. Átrio genital ausente, sendo os poros genitais masculino e feminino muito próximos, situados para fóra do campo cecal esquerdo. Bolsa do cirro disposta em posição inclinada no terço anterior do corpo; apresenta a porção basal, correspondente à parte prostática, muito dilatada e a porção distal tubular, delicada, contendo o ducto ejaculador e um penis ou cirro pequeno. Vesicula seminal longa, tubular, enovelada, externa. Testículos volumosos com lobulação mediana, situados simétricamente ao extremo posterior do corpo. Ovário arredondado, pretesticular, ligeiramente à direita da linha mediana. Complexo da glândula da casca situado atrás do ovário. Espermatéca ausente. Vitelinos constituidos por dois grupos com cerca de 20 foliculos volumosos, disseminados entre as margens laterais e os campos

cecais, desde o nivel da zona testicular até as proximidades da linha equatorial. Útero apresentando numerosas circunvoluções transversais, intracecais, extendendo-se para a frente da zona ovariana e atingindo a parte basal da bolsa do cirro. Vagina delgada e longa, envolta por células glandulares. Ovos numerosos, alongados, com um opérculo bem visivel na extremidade mais delgada, e apresentando um, raramente dois filamentos longos em cada polo, e outros muito delgados, em numero variavel, geralmente 3 a 5. Poro excretor mediano, posterior, subterminal. Vesícula excretora formada por um tronco tubular inferior com a base geralmente mais dilatada; na região da glândula da casca se divide em dois ramos, em forma de Y, que se dirigem para a frente pelas margens laterais. Os demais detalhes do aparelho excretor não foram observados.

Trabalhamos com um único lote desta espécie que consta de três exemplares, Lam. 9772 da Coleção do Inst. Oswaldo Cruz, com as seguintes indicações: *Chelone mydas*. Intestino grosso, Rio de Janeiro, Travassos col., 8-1-1923. Necrópsia 2048.

Medidas: Comprimento 8.37 a 8.93 mm. Largura máxima 2,13 a 2,26 mm.

Diâmetro da ventosa oral (transversal) 0,480 a 0,519 mm.

Comprimento do esôfago 0,300 a 0,430 mm. Bolsa do cirro cerca de 1,50 mm de comprimento por 0,39 mm de largura máxima; a largura da parte delgada (parte distal) varia entre 0,092 e 0.105 mm. Testículos 0,519 a 1,23 mm de comprimento por 0,789 a 0,894 mm de largura.

Ovário 0,394 a 0,450 mm de comprimento por 0,473 a 0,526 mm de largura.

Vagina 1,18 a 1,58 mm de conrimento por 0,066 a 0,080 mm de largura.

Distância entre o poro genital e a bifurcação cecal cerca de 1,05 mm.

Ovos 0,042 a 0,052 mm de comprimento por 0,019 a 0,022 mm de largura; o filamento maior méde cerca de 10 vezes o comprimento dos ovos.

Discussão: Esta espécie foi primeiramente descrita por Loos (1901), sob o nome *Glyphicephalus crassus*, de material coletado no Egipto, do intestino de *Caretta caretta* (= *Thalassochelys corticata*). Em 1902 o autor redescreve a espécie mais detalhadamente transferindo-a para um novo gênero, *Epibathra*, passando a denominar-se *Epibathra crassa*. Segundo nosso conceito o gênero *Epibathra* é idêntico a *Pyelosomum* (vide discussão sobre o gên. *Pyelosomum*) desta forma a referila espécie passa a denominar-se *Pylosimum crassus* (Ls.).

Nossa descrição difere da de Looss em alguns pontos, principalmente no tamanho (4,0 a 6,0 mm seg. Looss), forma da bolsa do cirro, extensão e número dos foliculos vitelinos.

A espécie descrita por Oguro em 1936, *Pyelosomum posterorchis*, baseado em dois exemplares do intestino de *Eretmochelys imbricata* (*E. squamosa*). do

Japão, difere aparentemente da primeira pelo tamanho dos ovos, que são ligeiramente maiores, e da bolsa do cirro que parece menos desenvolvida; o esôfago é mais curto e os cecos, que parecem mais sinuosos, dobram-se para dentro depois de passarem a zona testicular; os testículos são um pouco mais lobados. Estamos tendentes a crer que futuros estudos com material mais abundante possam demonstrar a identidade destas duas espécies.

D — Gênero *Pleurogonius* Looss, 1901 emend.

5 — *Pleurogonius longiusculus* (v. Beneden, 1859) Loosss, 1901

(figs. 30, 31, 32, 33, 34)

Descrição: Corpo muito alongado com a extremidade posterior arredondada e a anterior terminando em forma de lança, com nítido colar cefálico que apresenta uma depressão pronunciada na face ventral. Cutícula lisa. Ventosa oral terminal, de contorno circular. Faringe ausente. Esôfago delgado, medianamente longo. Cecos delicados, ligeiramente crenulados, paralelos, passando entre os testículos e extendendo-se até o nivel do poro excretor, nas proximidades do extremo posterior do corpo. Poro genital situado no quarto anterior do corpo, ligeiramente desviado da linha mediana. Bolsa do cirro situada no terço anterior e dirigida no sentido do maior eixo; apresenta uma porção distal delgada e uma porção basal mais volumosa, menos extensa, que corresponde à parte prostática; a porção delgada envolve um cirro tubular e um longo ducto ejaculador. Apenas pequena parte da vesícula seminal penetra a bolsa do cirro sendo no mais externa, constituida por um longo tubo circunvoluido. Testículos de contorno irregular, situados simétricamente na parte posterior do corpo. Ovário de contorno liso, globóide, situado acima da zona testicular e ligeiramente à direita da linha mediana. Complexo da glândula da casca posterior ao ovário, mediano. Espermatéca ausente. Canal de Laurer presente. Vitelinos constituidos por dois grupos laterais e extracecais de folículos pequenos e numerosos (cerca de 80 de cada lado), com tendência a formar pequenos cachos de 4 a 6 elementos; as glândulas vitelinas extendem-se da zona testicular para cima atingindo as proximidades da linha equatorial. Útero apresentando numerosas circunvoluções enclinadas para a linha mediana, ocupando toda a área intracecal compreendida entre a zona ovariana e a linha que divide os terços médio e anterior. Vagina tubular, longa, paralela à bolsa do cirro. Ovos numerosos, elipsóides, operculados, apresentando um longo filamento em cada polo. Poro excretor mediano, posterior, de forma elipsóide, alongado no sentido longitudi-

nal. Vesícula excretora tubular, com a porção basal mais dilatada: em nosso material não é possível distinguir o ponto exato da bifurcação; os ramos laterais dirigem-se para a frente e terminam em fundo cego na região cefálica.

Trabalhamos com um só lote de dois exemplares desta espécie: Lam. 9770 da Coleção do Inst. Oswaldo Cruz, com as seguintes indicações: *Chelone mydas*. Intestino. Rio de Janeiro, Travassos col..

Medidas: Comprimento 8,0 a 8,3 mm. Largura 0,89 a 1,05 mm.

Ventosa oral 0,157 de diâmetro transversal. Esôfago 0,572 a 0,629 mm de comprimento. Bolsa do cirro 0,820 a 0,989 mm de comprimento por 0,141 mm de largura máxima. Diâmetro dos testículos 0,260 a 0,394 mm. Ovário 0,184 a 0,197 mm de diâmetro. Vagina 0,657 a 0,736 mm de comprimento por 0,092 a 0,079 mm de largura. Distância entre o poro genital e a bifurcação cecal 0,789 a 1,052 mm. Ovos 0,027 de comprimento por 0,013 mm de largura; os filamentos têm cerca de 10 × o comprimento dos ovos.

* * *

Nossa descrição difere da de Looss quanto ao tamanho do corpo (cerca de 10,7 seg. Looss, 13,5 mm seg. v. Beneden) e da bolsa do cirro bem como pelo número e extensão dos folículos vitelinos.

* * *

6 — *Pleurogonius trigonocephalus* (Rudolphi, 1809) Looss, 1901

(fig. 35)

Não tivemos em mão material desta espécie. Transcrevemos a descrição original de Rudolphi (1809), adaptamos a redescrição de Braun (1901), e reproduzimos a figura apresentada por este autor.

Descrição (seg. Rudolphi):

"*Monostoma trigonocephalum*, R.

Monostoma: capite trigono, corpore hinc convexo, illinc concavo. — Braun in litteris: *Planaria Mydae* — *Hab.* Specimina quinque in ventriculo *Testudinis Mydae* a se reperta cl. Braun mecum communicavit.

Descr. — Vermes unam cum dimidia, duasve lineas longi, tertiam lineae partem lati. Color in spiritu vini fuscus redditus. *Caput* trigonum, discretum, angulisposticis exstantibus, *poro* terminali orbiculari hiante. *Corpus* capite te-

nuius, hinc (dorso) convexum, illinc (ventre) excavatum, apice caudalis marginibusque lateralibus obtusis.

Cirrus quatuor in speciminibus infra capitis marginem inferiorem exsertus, in quinto occultatus. — *Obs.* Amiciss. Braun cirri occultati tuberculum planum pro poro ventrali sumsit."

Descrição (seg. Braun):

"— Os presentes exmplares de *Monostomum trigonocephalum* (frasco n.º 1337 da coleção de Berlin) têm todos a forma de um *C*. recurvos para o lado ventral que é concavo; o lado dorsal é convexo; o comprimento do corpo atinge 3 a 3.5 mm e a largura menos de 1,0 mm. A extremidade anterior se apresenta como uma dilatação triangular, pouco saliente para os lados; na parte médio-ventral forma-se um ângulo de modo que visto dessa face tem-se a impressão de um coração invertido; de fronte a esse ângulo forma-se uma escavação triangular com o vértice voltado para a frente. O colar cefálico é musculoso. A boca situa-se na extremidade anterior, na ventosa oral, que mede 0,125 mm de comprimento por 0,156 mm de largura. Faz continuação à boca o esôfago que é delgado e méde 0,5 mm de comprimento; não se observa bulbo esofagiano (Ringmuskellage) sobre a base da bifurcação cecal; ésta forma um ângulo de 45º voltado para baixo; os cecos são longos e apresentam pequenas dilatações laterais; antes de atingirem a zona testicular se recurvam para a linha mediana e assumem a forma de um X, que Walter foi o primeiro a figurar; a porção caudal dos cecos é geralmente dilatada. O poro genital está situado atrás da bifurcação cecal, um tanto desviado para o lado esquerdo. A bolsa do cirro é alongada e com a forma de um *C* a seu lado situando-se o metratermo que tem a forma de uma bolsa; estas duas formações são fáceis de observar. O metratermo é regularmente espesso e revestido de células glandulares. Os testiculos são ovais ou arredondados e estão situados simétricamente na extremidade posterior do corpo; pode-se observar uma extrutura de contorno lobulado que segundo minha observação se formam por causa da cuticula pregueada. Os vasos eferentes não foram observados. A vesicula seminal, fortemente lobulada, fica para trás da bolsa do cirro. O ovário, geralmente grande e arredondado, fica situado assimétricamente para a frente do testiculo direito. A glândula da casca fica situada um pouco atrás do ovário, sendo pequena. O útero parte desse nivel e se dirige para a frente formando alças grossas e juxtapostas. Mais ou menos da metade do corpo até a zona testicular, observa-se, de cada lado, para fora dos cecos, uma fileira de foliculos vitelinos. O animal de perfil mostra, de cada lado, duas de tais fileiras, uma dorsal e outra ventral, nas quais os foliculos se alternam mais ou menos regularmente; pela observação de frente vê-se apenas uma fileira continua de foliculos. A medida dos ovos e ainda mais a

dos filamentos porventura existentes, oferece grande dificuldade, pelo fato de ficarem muito aproximados uns dos outros. Devo desde logo fazer notar que não encontrei filamentos em grande número de exemplares. Em ovos, sem os filamentos, verifico o comprimento de 0,028 mm e 0,014 mm de largura."

7 — *Pleurogonius linearis* Looss, 1901

(figs. 19, 23, 24, 28)

Descrição: Corpo alongado com os bordos recurvados para a face ventral, que forma uma concavidade dando idéa de naveta; extremidade anterior lanceolar apresentando nitido colar cefálico interrompido na face ventral por uma depressão em forma de *V* invertido; extremidade posterior arredondada. Cutícula inerme. Ventosa oral forte, de contorno circular. Faringe ausente. Esôfago delgado e longo. Cecos delgados apresentando pequenos divertículos laterais; ao nivel da zona testicular convergem para a linha mediana do corpo passando entre os testiculos e terminando lógo abaixo dos mesmos. Átrio genital ausente. Poros genitais masculino e feminino, separados, muito próximos, intracecais, situados a certa distância da bifurcação cecal e à esquerda da linha mediana do corpo. Bolsa do cirro bem desenvolvida, tubular, com a parte basal mais volumosa, situada na metade anterior do corpo e dirigida no sentido longitudinal; contem um circo tubular, ducto ejaculador e uma parte prostática, que corresponde a cerca de 1/3 do comprimento da bolsa, claviforme e rodeada por numerosas células glandulares. Vesícula seminal em sua maior parte externa, constituida por um longo tubo irregularmente enovelado. Testículos volumosos, irregularmente lobados, com campos afastados e zonas coincidentes, situados na extremidade posterior do corpo. Ovário ligeiramente lobado, imediatamente pretesticular e um pouco desviado para a direita da linha mediana. Glândula de Mehlis imediatament postovariana. Espermatéca ausente. Canal de Laurer não observado. Vitelinos formados por dois grupos de foliculos volumosos disseminados nos campos laterais, extracecais, pretesticulares, não atingindo a linha equatorial, para cima. Útero formando numerosas alças horizontais que se extendem desde a zona ovariana até a base da bolsa do cirro, intra e extracecais. Vagina tubular, paralela à bolsa do cirro. Ovos numerosos, elipsóides, com um longo filamento em cada polo. Poro excretor mediano, subterminal, com uma abertura muito evidente, de contorno ovalado. Vesícula excretora praticamente nula a bifurcação em dois ramos laterais dando-se logo acima do poro excretor; os ramos laterais se dirigem para a frente pelas margens do limite uterino; o percurso total não foi observado.

Trabalhamos com 5 exemplares desta espécie cujas medidas damos no quadro abaixo. O material proveniente da necrópsia 2127, 4-12-1939, pertence à Coleção do Instituto Butantan.

Os nossos exemplares diferem dos de Looss e de Oguro em todas as dimensões, com exceção da dos ovos, largura dos cecos e extensão das alças uterinas, caracteres que não julgamos suficientes, no caso, para justificarem a diferenciação de uma espécie distinta.

Quadro de medidas, em mm

Comprimento	4,00	3,75	4,66	4,26	3,65
Largura máxima	2,20	0,99	1,06	1,19	0,93
Ventosa oral (diâm.) ...	0,150	0,113	0,155	0,155	0,123
Esôfago (compr.)	0,603	0,438	0,523	0,395	0,395
Bolsa do cirro (comprimento	0,84	0,84	0,92	0,92	0,84
(largura) . .	0,15	0,11	0,15	0,15	0,14
Test. direito (diâm.)	0,424	0,339	0,381	0,424	0,311
Test. esquerdo (diâm.) .	0,424	0,282	0,311	0,424	0,311
Ovário (diâm. transv.) .	0,282	0,211	0,282	0,325	0,282
Vagina (compr.)	0,880	0,848	0,919	0,843	—
Ovos	Média: 0,032 de comprimento por 0,018 mm de largura. Variações: 0,028 - 0,036 × 0,015 - 0,022. Filamentos: cêrca de 0,290 mm.				

8 — *Pleurogonius lobatus* (Looss, 1901)

(figs. 5, 6)

Descrição: Corpo alongado com a extremidade posterior arredondada e a anterior lanceolar, apresentando um colar cefálico bem nitido, cuja porção ventral forma uma depressão pouco pronunciada. Cutícula lisa. Ventosa oral terminal, de contorno circular. Faringe ausente. Esôfago medianamente longo. Cecos de bordos crenulados, paralelos, passando entre os testiculos e terminando atrás dos mesmos. Átrio genital não observado. Poros genitais muito próximos situados ao nivel da metade do 1/3 anterior do corpo, desviados da linha mediana, imediatamente para fora do campo cecal. Bolsa o cirro desenvolvida, piriforme alongada, com a porção basal mais dilatada, situada no terço anterior e dirigida, à principio, no sentido longitudinal, e depois inclinando-se para a esquerda; contem um cirro tubular e uma parte prostática tambem tubular porem mais calibrosa. Vesícula seminal constituida por um longo tubo circunvoluido, situado para trás da bolsa do cirro, livre no parênquima. Testiculos muito volumosos, globóides, ocupando a maior parte da extremidade posterior, onde o

corpo se apresenta mais dilatado. Em alguns exemplares observa-se a atrofia de um dos testiculos. Apresentam os testiculos zonas em perfeita coincidencia e campos contiguos. Ovário arredondado, prétesticular, ligeiramente desviado da linha mediana. Complexo da glândua da casca postovariano. Espermatéca ausente. Canal de Laurer não observado. Vitelinos compostos de foliculos volumosos dispostos em duas fileiras longitudinais, uma em cada lado dos campos extracecais, desde a zona testicular até o nivel da linha equatorial. Útero apresentando numerosas circunvoluções, mais ou menos inclinadas para a linha mediana, que se extendem para cima do ovário até a base da bolsa do cirro, ocupando toda a área intracecal e parcialmente extracecal dessa região. Vagina pouco desenvolvida, paralela e externa à bolsa do cirro, apresentando células ao redor. Ovos numerosos, elipsóides, operculados, com um longo filamento em cada polo. Poro excretor de contorno elipsóide, bem evidente, subterminal. Vesicula excretora tubular dirigindo-se para a frente ao longo da linha mediana, entre os testiculos, bifurcando-se abaixo da glândula de Mehlis em forma de *Y*; ramos laterais dirigindo-se para a frente e atingindo a região cefálica onde terminam em fundo cego.

Trabalhamos com o seguinte material:

9 exemplares — *Chelone mydas*. Intestino delgado. Rio Estrela, Rio de Janeiro, Lent & Freitas col., 23-9-1937. Necrópsia 5815. Lam. 9888 da Coleção do Inst. Oswaldo Cruz.

4 exemplares — *Chelone mydas*. Estomago. Rio Estrela, Rio de Janeiro, Lent & Freitas col., 23-9-1937. Necrópsia 5815. Tubo 9941 da Coleção do Inst. Oswaldo Cruz.

* * *

Nossa descrição apresenta pequenas discordâncias com as de Looss e Oguro, que reputamos de menor importância; alem disso as dimensões dos ovos sofre variações nas três descriçõe:

0,032 a 0,034 de compr. por 0,018 a 0,019 mm, seg. Looss;
0,027 a 0,035 de compr. por 0,011 a 0,015 mm, seg. Oguro e
0,026 a 0,030 de compr. por 0,013 a 0,018 mm, segundo nós.

* * *

Medidas: Comprimento 4,70 a 4,90 mm. Largura 0,80 a 0,99 mm. Ventosa oral 0,143 a 0,146 mm de diâmetro transversal. Esôfago 0,572 a 0,672 mm de comprimento. Distância entre a bifurcação cecal e o poro genital 0,200 a 0,316 mm. Bolsa do cirro 0,608 a 0,707 mm de comprimento por 0,183 a 0,226 mm de largura máxima. Testiculos 0,579 a 0,710 mm de comprimento

por 0,263 a 0,500 mm de largura. Ovário 0,210 a 0,240 mm de diâmetro transverso. Vagina 0,263 a 0,320 mm de comprimento por 0,040 a 0,050 mm de largura. Ovos com as dimensões já referidas: a casca dos ovos mede 0,014 mm de espessura e os filamentos cerca de 0,130 mm em média.

II — Subfamília NOTOCOTYLINAE Kossack, 1911

A — Gênero *Paramonostomum* Luehe, 1909

9 — *Paramonostomum ionornc* Travassos, 1921

(fig. 36)

Não tivemos em mão material desta espécie: reproduzimos a descrição e figura original de Travassos.

Descrição: "Comprimento: 3,2 mm; largura 1,5 mm.

Corpo liso, atenuado anteriormente, concavo ventralmente e convexo dorsalmente; ventosa oral circular com 0,21 mm de diâmetro; faringe e esôfago nulos; cecos extendendo-se até perto da extremidade posterior na primeira porção, são divergentes até o início das alças uterinas, tornando-se então paralelos até quasi a zona testicular, onde convergem bruscamente para se colocarem entre os testículos e ovário, onde novamente são paralalos; poro genital bifurcal; bolsa do cirro com 0,61 mm de comprimento, musculosa, contendo um cirro espinhoso e vesícula seminal pequena; testículos alongados e profundamente lobados, medem 0,50 por 0,21 e 0,52 por 0,21 mm; zonas coincidindo, campos afastados, extracecais; ovário profundamente lobado, mede 0,33 por 0,035 mm, na zona testicular, intracecal; útero ascendente, com numerosas alças transversais, vagina musculosa e guarnecida de numerosas glândulas, mede 0,49 mm de comprimento; ovos com 0,019 mm de comprimento por 0,012 mm de largura; poro excretor entre as terminações dos cecos.

Habitat: Cecos de *Ionornis martinica* (L) e *Limnopardalis rythirhynchus* (Vieill).

Procedência: Santa Cruz, Rio de Janeiro."

III — Subfamília NUDACOTYLINAE Barker, 1916

A — Gênero *Nudacotyle* Barker, 1916

10 — *Nudacotyle valdevaginatus* Travassos, 1922

(figs. 63, 64)

Não trabalhamos com esta espécie. Apresentamos a descrição e figuras de Travassos (1939).

Descrição: "Comprimento cerca d 1,3 mm. Largura máxima 0,8 mm ao nivel do poro genital.

Corpo subpiriforme, escavado ventralmente, a extremidade posterior sendo muito mais espêssa. Cuticula lisa. Ventosa oral pequena, forte, subterminal e medindo cerca de 0,14 a 0,15 mm de diâmetro. Esôfago sem faringe, curto. Cecos delgados, longos, muito afastados das margens do corpo e se extendendo posteriormente até a zona testicular. Poros genitais laterais, postequatoriais e isolados. Bolsa do cirro muito volumosa e parecendo muscular; é situada obliquamente adiante ou parcialmente na zona dos testiculos; mede cerca de 0,40 mm de comprimento e contem cirro, próstata e vesicula seminal. Externamente à bolsa do cirro existe uma outra vesicula seminal muito desenvolvida e enovelada, situada adiante e na zona dos testiculos. Testiculos situados posteriormente, com zonas coincidindo e campos afastados; medem cerca de 0,19 a 0,21 mm de comprimento por 0,15 a 0,16 mm de largura, e são ligeiramente lobados. Vagina muito musculosa e grande, dirigida de diante para trás, mais ou menos obliquamente invadindo a zona testicular. Ovário muito lobado, situado abaixo da zona testicular que é ligeiramente invadida, mediano; mede cerca de 0,16 mm de diâmetro. Glândula de Mehlis preovariana, entre os testiculos. Canal de Laurer e espermatéca ausentes. Útero com um ramo ascendente e outro descendente, formando alças transversais que invadem a área extracecal. Ovos com cerca de 0,020 por 0,012 mm e tendo em cada polo um forte e longo filamento polar. Vitelinos laterais com poucos ácinos relativamente grandes: são situados abaixo da zona dos poros genitais e parcialmente na zona testicular. No lado oposto aos poros genitais, ficam na área da vesicula seminal externa.

Habitat: Intestino delgado de *Hydrochoerus capybara* L.

Distribuição geográfica: Mato Grosso, Brasil."

11 — *Nudacotyle tertius* Travassos, 1939

(figs. 58-60)

Não trabalhamos com esta espécie. Reproduzimos a descrição e figuras do original.

Descrição: "Comprimento 0,78 a 1,11 mm. Largura máxima 0,42 a 0,60 mm, ao nivel da zona dos vitelinos. Corpo de contorno elipsóide, escavado ventralmente, sendo a metade posterior mais espêssa que a anterior. Cuticula aparentemente lisa. Ventosa oral subterminal, pequena e forte; mede cerca de 0,075 a 0,090 mm de diâmetro. Esôfago sem faringe, com cerca de 0,09 a 0,12 mm de comprimento. Cecos delgados, muito afastados das margens do corpo, extendendo-se até perto da extremidade posterior e terminando na zona tes-

ticular para dentro dos campos destes. Póros genitais próximos, laterais, na zona testicular. Bolsa do cirro volumosa e fortemente muscular; mede cerca de 0,21 a 0,36 mm de comprimento por 0,090 a 0,130 mm de maior largura, situada obliquamente de trás para diante e contem cirro, próstata e vesicula seminal interna sacciforme. Existe uma vesicula seminal externa longa e delgada formando 2 ou 3 alças situadas acima e na zona testicular. Vagina com forte musculatura obliqua ou em forma de virgula; mede cerca de 0,135 a 0,240 mm de comprimento por 0,020 a 0,030 mm de maior largura.. Ovário muito lobado, situado abaixo da zona dos testículos e no campo do testiculo oposto ao poro genital; mede cerca de 0,15 a 0,21 mm de diâmetro. Glândula de Mehlis entre os testículos e na zona e adiante da zona do ovário. Canal de Laurer e espermatéca ausentes. Útero constituido por um ramo ascendente e outro descendente que formam alças transversais que ocupam toda a área do corpo acima da zona dos vitelinos e abaixo da ventosa oral. Ovos com fortes e longos prolongamentos polares, medem cerca de 0,024 a 0,028 mm por 0,015 a 0,016 mm; os filamentos polares medem cerca de 0,10 mm de comprimento. Vitelinos constituidos por poucos foliculos relativamente volumosos, extracecais, situados acima da zona testicular e da zona dos poros genitais. O conjunto dos foliculos mede cerca de 0,15 a 0,21 mm por 0,105 a 0,120 mm.

Habitat: Intestino delgado de *Hydrochoerus capybara* L.

Proveniência: Sobradinho, Estrela Velha, Estado do Rio — Brasil."

B — Gênero *Neocotyle* Travassos, 1922

12 — *Neocotyle neocotyle* Travassos, 1922

(fig. 65)

Não tivemos em mão exemplares desta espécie. Reproduzimos a descrição e uma figura de Travassos (1939).

Descrição: "Comprimento 2,6 mm, largura máxima 0,7 a 0,9 mm ao nivel dos poros genitais. Corpo de contorno piriforme, escavado ventralmente e muito mais espêsso na porção posterior. Cuticula lisa. Ventosa oral pequena, musculosa, subterminal e medindo cerca de 0,14 a 0,17 mm de diâmetro. Esôfago sem faringe. Cecos delgados, longos, muito afastados das margens do corpo; terminam perto da extremidade posterior. Poros genitais contíguos, perto da extremidade posterior do corpo, laterais. Bolsa do cirro grande, transversalmente obliqua, com cêrca de 0,43 mm de comprimento, contendo cirro, próstata e vesicula seminal interna. Vesicula seminal externa grande, mas não enovelada. Testiculos lobados, com zonas coincidindo e campos afastados; me-

dem cerca de 0,21 a 0,35 mm de diâmetro. Vagina forte e musculosa, obliqua ou encurvada. Ovário muito lobado, prétesticular, no campo em oposição aos poros genitais; mede cerca de 0,35 por 0,17 mm de diâmetro. Glândula de Mehlis na zona do ovário, mediana. Canal de Laurer e espermatéca ausentes. Útero com ramo ascendente e outro descendente formando alças transversais que invadem toda a área do corpo acima da bolsa do cirro e abaixo da zona da ventosa oral. Ovos operculados, com um grosso filamento em cada polo; medem cerca de 0,020 por 0,012 mm; os filamentos medem cerca de 0,075 mm de comprimento. Vitelinos com cerca de 11 folículos, dispostos lateralmente na área extracecal e acima da zona da bolsa do cirro; são parcialmente envolvidos pelas alças intestinais.

Habitat: Intestino delgado de *Hydrochoerus capybara* L.

Distribuição geográfica: Mato Grosso, Brasil."

IV — Subfamília CHOANOPHORINAE Caballero, 1942

A — Gênero *Metacetabulum* Freitas & Lent, 1938

13 — *Metacetabulum invaginatum* Freitas & Lent, 1938

(figs. 37-57)

Descrição: Corpo de tamanho médio, alongado. Exemplares não comprimidos apresentam a seguinte morfologia externa: corpo um tanto recurvo para o lado ventral, em forma de virgula; a extremidade anterior, isto é, a porção compreendida para a frente do poro genital é bem achatada, a face dorsal sendo côncava e a ventral convexa, de modo a formar uma cavidade em forma de "canôa" ou de "colher"; nessa extremidade, mais aguçada na ponta, localiza-se a ventosa oral, que é terminal; a parte basal da concavidade termina num plano tangente à linha mediana do corpo, formando uma espécie de plataforma circular onde se localiza o poro genital; é constante a verificação da parte distal do cirro emergindo desse ponto. Do nivel do poro genital para trás, o corpo é cilíndrico e as dobras a camada cuticular, sempre pronunciadas, dão-lhe um aspecto estriado no sentido transverso. A porção terminal ou posterior, também cilíndrica, apresenta um diâmetro bem menor. No limite de separação entre as duas partes, conforme o grão de distensão do helminto, as pregas cuticulares são muito grandes; a porção delgada é retractil podendo apresentar, consequentemente, um comprimento variavel, sendo que frequentemente não é visivel e, nestas condições, a extremidade posterior do corpo é simplesmente arredondada, com um diâmetro bem maior. A porção retractil apresenta a parte

terminal truncada no centro da qual observa-se um orifício circular que é o poro excretor: esse orifício, aparentemente, não ocupa sempre uma posição determinada, podendo ser terminal ou subterminal e, neste caso, a porção que lhe segue para fora pode dilatar-se novamente dando formação a uma espécie de pseudo-ventosa suceptivel de fixar-se num substracto solido, conforme verificaram Freitas e Lent em material vivo. Nos exemplares contraidos o poro excretor é terminal e aparece sob a forma de um esfincter, devido aos feixes de músculos circulares.

Em cortes histológicos observa-se a seguinte morfologia: a cutícula, inérme em toda a extensão, é representada por uma camada espessa sendo seguida por uma camada subcuticular de espessura quasi idêntica; para dentro dessa camada observamos progressivamente uma camada delgada de fibras musculares circulares, uma camada de fibras musculares longitudinais, de espessura variavel conforme a região, uma camada mais ou menos densa de células aparentemente glandulares, e, finalmente, o parênquima formado por células grandes de paredes delgadas e contorno pouco regular, entre as quais observam-se numerosas fibras musculares diagonais, em toda a superfície corporal. Como é regra geral nos trematóides, a porção anterior é muito mais musculosa que o restante do corpo.

Em material montado observamos: uma ventosa oral pequena e de contorno circular, terminal seguida por um esôfago relativamente curto; cecos simples, longos, de comprimento desigual, atingindo as proximidades do extremo posterior. Poro genital não muito distante da bifurcação cecal. Bolsa do cirro bem desenvolvida, dorsal, situada no terço anterior do corpo, recurvada em forma de *C* ou de *S*, contendo um cirro muito desenvolvido, tortuoso, e uma porção prostática grande rodeada por densa camada glandular. A vesícula seminal é em sua grande maioria externa, constituida por um calibroso tubo muito enovelado situado imediatamente atrás da bolsa do cirro. Testículos volumosos, de contorno liso, intracecais, postequatoriais, postovarianos, com campos coincidentes e zonas contiguas. Ovário dorsal, submediano, postuterino, intracecal. Glândula de Mehlis muito grande, situada atrás do ovário. Espermateca ausente. Canal de Laurer presente. Vitelinos constituidos por um número relativamente pequeno de folículos volumosos disseminados acima da zona ovariana, numa área pequena, intra e extracecais. Útero bem desenvolvido, com numerosas alças transversais, intracecais, ocupando toda a porção mediana do corpo compreendida entre a zona ovariana e a base da bolsa do cirro. Vagina muito musculosa, contorno um tanto sinuoso, circundada por uma camada glandular bem espessa, situada dorsalmente e à esquerda da bolsa do cirro. Ovos alongados, de casca fina, operculados, apresentando um pequeno tuberculo em cada polo.

Estudo do aparelho excretor: foi feito em exemplares montados *in toto* bem como em cortes seriados longitudinais e transversais. Os detalhes da parte vesicular foram observados em toda a extensão. O estudo de vários exemplares cortados em série mostrou que a porção terminal do aparelho excretor é constituida por um "*vestibulo*" ou "*vesícula excretora secundária*", semelhante à "*secondary bladder*" observada nas espécies do gênero *Macravestibulum*, embora de formato um pouco diverso. A porção *vestibular* corresponde à porção retractil da extremidade posterior. Nos exemplares montados *in toto* aparece sob a forma de uma mancha escura, funilada, alongada, apresentando numerosas estrias transversais mais escuras, não sendo visivel outro detalhe. Pelos cortes verifica-se que êssa porção escura é constituida por uma densa camada de células glandulares pequenas e que as estrias nada mais são que dobras profundas da camada externa, que limita uma grande cavidade, o "vestibulo". Histológicamente essa camada é idêntica à camada cuticular e seu conjunto, com diferenças apenas quantitativas, o que mostra a sua origem ectodérmica, conforme se verifica no gênero *Macravestibulum*, segundo a verificação de Hsü (1937).

A porção distal do "vestíbulo" funciona como poro excretor e a basal se comunica com a vesícula excretora, que pode ser chamada "primaria", por meio de um orifício central muito pequeno. A vesícula excretora é pouco desenvolvida, com limites muito vagos; consideramos como parte vesicular a porção situada atrás da bifurcação; essa porção às vezes é quasi nula. A extrutura dessa parte é bem diversa da porção vestibular: as paredes são mais delgadas, não existem as camadas musculares nem a camada glandular. A bifurcação é formada por dois coletores principais que se dirigem para a frente; um dos canais coletores é geralmente bem mais calibroso na porção basal e as suas paredes aqui são mais espessas; a uma certa altura ambos se igualam em calibre; o seu percurso é feito ao longo dos campos laterais, sendo ventrais e paralelos aos cecos. Na porção anterior e escavada do corpo, os canais excretores se bifurcam duas vezes consecutivas de modo a formar 3 ramos finos de cada lado do corpo; estes formam uma série de ligações laterais fundindo-se ao nivel da ventosa oral; este aspecto é algo semelhante ao observado no sistema excretor de *Ogmocotyle indica* (= *Cymbiforma indica*), conforme a descrição de Bhalerao (1942); por outro lado assemelha-se, até certo ponto, com a porção anterior do sistema linfático de *Polyangium linguatula* (= *Microscapha linguatula* Looss), segundo Looss (1899). Não foram observadas ramificações laterais.

* * *

Notamos grande variação de talhe nesta espécie. As medidas dadas por Freitas e Lent na descrição original, representam mais ou menos a média das

nossas. Damos um quadro de medidas em *mm*, baseadas sobre 10 exemplares adultos, comprimidos e montados pela técnica habitual.

Exemplar:	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
Comprimento	3,817	3,959	3,817	3,817	7,700	14,66	16,52	15,46	12,79	17,02
Largura	0,848	0,848	1,060	1,060	1,272	1,59	1,86	1,86	1,59	1,86
Ventosa oral (diâmetro)	0,113	0,113	0,113	0,113	0,113	0,127	0,141	0,147	0,127	?
Bolsa do cirro	0,565 × 0,155	0,49 × 0,141	0,70 × 0,212	0,63 × 0,183	0,91 × 0,212	1,86 × 0,266	2,13 × 0,399	1,73 × 0,373	1,46 × 0,399	1,59 × 0,399
Vagina ...	0,42 × 0,08	0,35 × —	0,56 × 0,07	0,49 × 0,09	0,56 × 0,11	0,93 × 0,18	1,19 × 0,26	1,08 × 0,21	1,08 × 0,18	1,33 × 0,15
Testiculo ant. (diâm.)	0,494	0,565	0,608	0,664	0,820	1,013	1,088	1,088	1,088	1,199
Testiculo post. (diâm.)	0,494	0,565	0,707	0,664	0,820	0,956	1,013	1,146	1,088	1,199
Ovário (diâmetro) ...	0,349	0,353	0,353	0,424	0,494	0,559	0,533	0,586	0,586	0,666
Ovos ...	0,03 × 0,014	0,028 × 0,014	0,030 × 0,014	0,028 × 0,014	0,030 × 0,012	0,029 × 0,013	0,034 × 0,014	0,032 × 0,014	0,031 × 0,01[illegible]	0,039 × 0,014
Esôfago ...	—	0,098	0,127	0,113	—	0,159	0,346	0,266	0,186	0,186
Vitelinos (diâmetro folículos)	0,07 a 0,09	0,07 a 0,12	0,09 a 0,16	0,13 a 0,14	0,10 a 0,14	0,18 a 0,26	0,20 a 0,2[illegible]	0,15 a 0,26	0,15 a 0,26	0,15 a 0,26

Posição sistemática de Metacebulum invaginatum.

Freitas e Lent (1938) basearam sua descrição em três exemplares, estudados vivos e após toto-montagem.

Trabalhamos com exemplares fixados, comprimidos e não comprimidos; em material montado não é possivel dicernir a morfologia interna da porção posterior e retractil do helminto; os ramos excretores e os detalhes da terminação anterior dos mesmos são, pelo contrário, bem evidentes e os referidos autores descreveram e figuraram corrétamente essa parte; a interpretação entretanto não foi precisa; provavelmente a analogia aparente da porção anterior com a do sistema linfático de outros trematóides parasitos de tartarugas marinhas concorreu para que essa parte fosse considerada como tal.

O fato da extremidade posterior poder fixar-se num substracto sólido induziu à interpretação de um "acetábulo rudimentar, não musculoso". Nestas condições o grupo sistemático mais achegado seria o dos PARAMPHISTOMOIDEA, onde foi o gênero incluido, numa nova família, METACETABULIDAE, proxima de MICROSCAPHIDIIDAE Trav.

Pelo estudo que fazemos desta espécie, constatando a inexistência de sistema linfático, que aliás não é atributo exclusivo dos PARAMPHISTOMOIDEA, e a ausência de ventosa ventral, considerando ainda o tipo morfológico geral, ou topografia dos orgãos genitais, não hesitamos em considera-la na familia PRONOCEPHALIDAE.

Atualmente verificamos, na referida família, quatro gêneros com particularidades anatômicas que os afasta dos demais gêneros aí incluidos, e apresentando entre si afinidades morfológicas muito evidente; são os seguintes: *Macravestibulum* Mackin, 1930, *Metacetabulum* Freitas & Lent, 1938, *Cetiosaccus* Gilbert, 1938 e *Choanophorus* Caballero, 1942.

Mackin não hesitou em enquadrar o gênero *Macravestibulum* na família PRONOCEPHALIDAE embora diferisse em vários pontos com a diagnose de Looss, como a posição do poro excretor (terminal), posição da glândula da casca e a localização intracecal dos vitelinos; em adição, acrescenta o autor, "the enormous development of the vestibular cavity is so striking and unique, that it has no parallel in the family".

Gilbert estabeleceu o gênero *Cetiosaccus* que colocou na subfamilia TELOPORINAE Stunkard, que só contem o genótipo, *Teloporia* Fukui, do qual o diferenciou pelo "excretory system with its glandular vesicle and united crura; the spherical cirrus sac and peculiar genital papillae, and the compactly coiled vesicle of two regions".

O gênero *Metacetabulum* é muito semelhante a *Cetiosaccus* não só na morfologia geral mas principalmente no aspecto da vesícula excretora e da parte vestibular, que Gilbert chamou simplesmente de "vesicula excretora"; pela sua descrição e desenho verifica-se que ésta parte é inteiramente semelhante à de *Metacetabulum;* segundo o autor "The excretory pore is at the extreme posterior end of the worm, and is surrounded by muscles. The excretory vesicle is unusual. It is very large and voluminous, filling at least the posterior fifth of the body. It has thick glandular, highly folded walls".

A descrição da espécie tipo do gênero *Choanophorus* foi baseada num único exemplar adulto; posteriormente Caballero encontra novo material constituido de formas jovens; o aparelho excretor não foi satisfatoriamnte descrito; provavelmente deverá ser mais achegado ao de *Macravestibulum* porque a parte desenvaginal é bifurcada. Somente estudos posteriores poderão elucidar esse detalhe, entretanto vemos no gênero *Choanophorus* muita analogia com *Macravestibulum, Metacetabulum* e *Cetiosaccus.*

Pelo que acabamos de expor achamos razoavel a inclusão dos quatro gêneros referidos num grupamento sistemático à parte que, atualmente consideramos na categoria de subfamília. Aceitamos pois como subfamília válida CHOANOPHORINAE Caballero, 1942, cujos caracteres deverão ser emendados conforme passamos a descrever páginas adiante.

Estava o presente trabalho composto, ao tomarmos conhecimento do trabalho de Jones et col. (*Jour. Morph.*, 77(3):285, 1945), no qual os autores descrevem uma nova espécie de *Metacetabulum, M. kepneri,* e incluem este gênero na subfamilia *Choanophorinae.*

2ª Parte

Revisão da família Pronocephalidae

Família PRONOCEPHALIDAE Looss, 1902 emend.

PRONOCEPHALIDAE Looss, 1902, p. 611.
NOTOCOTYLIDAE Lühe, 1909, p. 31.
NOTOCOTYLIDAE Lühe, 1909, emend. Yamaguti, 1933, p. 51.
NOTOCOTYLIDAE Lühe, 1909, emend. Harwood, 1939, p. 333.
OPISTHOTREMATIDAE Poche, 1925, pp. 213-215.
OPISTHOPORIDAE Fukui, 1929, p. 339.
TELOPORIDAE Fukui, 1933, p. 332.
TELOPORIIDAE Nicoll, 1933, p. 100.
METACETABULIDAE Freitas & Lent, 1938, p. 82.
PRONOCEPHALIDAE Looss, 1902, emend. Ruiz, 1944, p. 223.

Diagnose: Monostomideos de corpo geralmente achatado, com bordos laterais via de regra encurvados para a região ventral. Expansões na região cefálica (colar cefálico) e na extremidade posterior do corpo, presentes ou não, esta podendo ser retractil. Faringe ausente. Esôfago delgado. Cecos laterais terminando em alturas variaveis, quasi sempre terminando, em separado, nas proximidades do extremo posterior. Poro genital de situação variavel, situado no terço anterior do corpo no genótipo. Bolsa do cirro presente. Vagina presente. Tubo uterino apresentando numerosas circunvoluções, ocupando a região mediana do corpo. Ovário pré ou postesticular. Complexo da glândula da casca paraovariana. Vitelinos foliculares, distribuidos em dois grupos, geralmente laterais. Poro excretor situado ao nivel da linha mediana, na extremidade posterior do corpo. Vesícula excretora geralmente pouco desenvolvida; algumas formas (CHOANOPHORINAE) apresentam uma "grande vesícula secundaria" ou "vestibulo" de origem ectodérmica; troncos coletores principais simples ou apresentando ramificações laterais, anastomosadas ou não, atingindo a região cefálica onde se unem ou terminam em fundo cego.

Evolução em molúscos gasteropodos de água doce ou salgada; segundo hospedeiro intermediario inexistente. Cercárias, oriundas de rédias, apresentando cauda longa e encistando-se no meio exterior geralmente sobre o próprio molusco.

Parasitas de répteis, peixes, mamíferos e aves.

Gênero tipo: *Pronocephalus* Looss, 1899.

As diversas subfamilias incluidas em PRONOCEPHALIDAE podem ser diferenciadas pela seguinte chave:

1 — Bolsa do cirro e poro genital postuterinos, na metade posterior do corpo 2
Bolsa do cirro e poro genital preuterinos, na metade anterior do corpo 3

2 — Poro genital lateral e imediatamente acima da zona testicular; vitelinos situados nos campos laterais e extracecais; vesícula seminal externa presente .... NUDACOTYLINAE Barker, 1916
Poro genital na linha mediana e na extremidade posterior do corpo; vitelinos intracecais; vesicula seminal externa ausente ....
OPISTHOTREMATINAE, 1939

3 — Extremidade posterior do corpo geralmente invaginavel; "vesícula excretora secundaria" muito desenvolvida ... CHOANOPHORINAE Caballero, 1942
Extremidade posterior do corpo não invaginavel; "vesicula excretora secundaria" ausente 4

4 — Ovário postesticular; vitelinos postesticulares; extremidade posterior do corpo truncada e apresentando projeções papilares 5
Ovário pretesticular; vitelinos pretesticulares; extremidade posterior do corpo arredondada, sem formações papilares (exceção: *Cricocephalus albus* e *Pyelosomum amblyrhynchi*) 6

5 — Testiculos divididos em numerosos foliculos nitidamente separados ......
CHARAXICEPHALINAE Price, 1931

Testiculos, em número de dois, sem foliculos separados ....
NEOPRONOCEPHALINAE Mehra, 1932

6 — Colar cefálico ausente; complexo da glândula da casca pretesticular; parasitas de aves e mamiferos .... NOTOCOTYLINAE Kossack, 1911
Colar cefálico presente; complexo da glândula da casca postesticular; parasitas de répteis, peixes e mamíferos .... PRONOCEPHALINAE Looss, 1899

Subfamilia PRONOCEPHALINAE Looss, 1899, emend.

PRONOCEPHALINAE Looss, 1899, pp. 665, 668.
OPISTHOPORIDAE Fukui, 1929, p. 339.
OPISTHOPORINAE Price, 1931, p. 10.
PRONOCEPHALINAE Mehra, 1932.
TELOPORIDAE Fukui, 1933, p. 332.
TELOPORIINAE Stunkard, 1934, p. 219.
TELOPORIIDAE Nicoll, 1933, p. 100.

Diagnose: PRONOCEPHALIDAE; corpo de tamanho médio, alongado; superfície ventral sem formações glandulares (exceção: gênero *Adenogaster*); região cefálica apresentando uma dilatação ou colar característico; extremidade posterior usualmente arredondada e lisa. Poro genital situado na metade anterior do corpo. Testículos, em número de dois, situados no extremo posterior do corpo. Ovário pretesticular; complexo da glândula da casca usualmente postovariano. Útero intracecal podendo apresentar alças cecais e extracecais, no terço médio do corpo. Vitelinos constituidos por dois grupos de folículos que se extendem, nas margens do corpo, acima da zona testicular. Ovos numerosos com um ou mais filamentos polares. Parasitos de répteis, peixes e mamíferos.

Gênero tipo: *Pronocephalus* Looss, 1899.

Consideramos nesta subfamília oito gêneros como válidos segundo o novo conceito atual, que podem ser diferenciados segundo a seguinte chave:

1 — Cecos passando para fora dos testículos 2
Cecos passando para dentro ou sobre os testículos 3

2 — Testículos inclinados ou colocados lado a lado; extremidade posterior do corpo largamente arredondada .... *Pronocephalus* Looss, 1899
Testículos colocados um sobre o outro; extremidade posterior do corpo bruscamente estreitada .... *Teloporia* Fukui, 1933

3 — Bolsa do cirro dividida em duas porções por um estrangulamento nítido 4
Bolsa do cirro sem apresentar duas porções divididas por um estrangulamento 5

4 — Cecos apresentando longas ramificações laterais em toda a sua extensão .... *Cricocephalus* Looss, 1899
Cecos sem ramificações longas .... *Iguanacola* Gilbert, 1938

5 — Superfície ventral externa do corpo apresentando numerosas glândulas dispostas em filas longitudinais .... *Adenogaster* Loos, 1901
Superfície ventral do corpo sem formações glandulares 6

6 — Poro genital lateral situado acima da bifurcação cecal; testículos alongados e colocados em forma de *V*, os cecos não ultrapassam a zona dos mesmos .... *Renigonius* Mehra, 1939
Poro genital, lateral ou mediano, situado abaixo da bifurcação cecal; testículos não alongados, simétricamente opostos, os cecos ultrapassam a zona dos mesmos 7

7 — Ramos da vesícula excretora não apresentando ramificações laterais em toda a sua extensão .... *Pleurogonius* Looss, 1901
Ramos da vesicula excretora apresentando ramificações laterais em toda a extensão .... *Pyelosomum* Looss, 1899

Pronocephalus Looss, 1899

Pronocephalus Looss, 1899 pp. 551-666.
Pronocephalus Looss, 1901, p. 209.
Pronocephalus Looss, 1902, p. 615.
"*Pronocephacus*" Braun, 1901, p. 50 (erro).

Diagnose: *Pronocephalinae*. — Corpo de tamanho médio; extremidade anterior afilada; colar cefálico bem desenvolvido, continuo, formando uma depressão angulosa na parte médio-ventral; extremidade posterior arredondada. Cuticula inerme. Cecos delgados, sem divertículos laterais, longos, terminando na parte posterior do corpo. Poro genital intracecal, submediano, situado no terço anterior do corpo. Bolsa do cirro muito desenvolvida e musculosa. Vesícula seminal externa. Testiculos irregularmente arredondados ou ovalados, intra-cecais, no terço posterior do corpo com campos e zonas parcialmente coincidentes. Ovário ovalado, pretesticular, ao lado da linha mediana. Complexo da glândula da casca postovariano. Vitelinos compostos de ácnes regularmente volumosos, distribuidos em dois grupos laterais, extendendo-se da zona testicular até as proximidades da linha equatorial. Útero ocupando toda a região mediana do corpo. Vagina musculosa circundada por células glandulares. Ovos numerosos, elipsóides, apresentando um longo filamento em cada polo. Poro excretor mediano, posterior. Vesícula excretora mais ou menos volumosa, alongada passando entre os testiculos na forma de um "S" bifurcando-se ao nivel da glândula da casca; os ramos laterais dirigem-se para diante margeando os cecos, para fora, terminando em fundo cego nas proximidades da ventosa oral.

Parasita de quelônios marinhos.

Espécie tipo: *Pronocephalus trigonocephalus* Looss, 1899.

Pronocephalus trigonocephalus Looss, 1899

(figs. 1-4, 7-11, 15, 16, 22, 29)

Pronocephalus trigonocephalus (Rud. 1809) Looss, 1899 pp. 666, 756 pl. 31 fig. 84; pl. 32 figs. 85, 86, *nec* Rudolphi 1809.

Pronocephalus obliquus, Looss, 1901 p. 566.

Pronocephalus obliquus, Looss, 1902 p. 527 etc. pl. 25 fig. 55, 56; pl. 26 fig. 70; pl. 32 fig. 175, *pro parte* (?).

Pronocephalus obliquus, Oguro, 1936 pp. 5, 6 fig. 7.

Pronocephalus obliquus, Mehra, 1939, pp. 101-103 figs. 1, 2.

Habitat: Intestino.
Hosp.: Chelone mydas.
Distr. georgr.: Egito. India. Japão, Brasil.
Evolução: Desconhecida.

Observação: Looss descreveu o gênero *Pronocephalus* em 1899 tendo como espécie tipo *Pronocephalus trigonocephalus* (Rud., 1809). Looss trabalhou com exemplares que identificou a *Monostoma trigonocephalum* Rud., 1809. Em 1901, Braun que examinou os originais de Rudolphi, mostra que a espécie de Loos não corresponde à daquêle autor. Looss (1901) concordou com Braun admitindo que a espécie tipo do gênero *Pronocephalus* não é *Monostoma trigonocephalum* (Rud., 1809, e toma a seguinte resolução.

1 — substitue a denominação *Pronocephalus trigonocephalus* pela de *Pronocephalus obliquus* "n. sp."

2 — *Monostoma trigonocephalum* Rud., é colocada no gênero *Pleurogonius*, passando a denominar-se *Pleurogonius trigonocephalus* (Rud.,).

Por outro lado, cumpre notar que em 1901 Looss considerou como espécie idêntica à observada em 1899 uma espécie aparentemente distinta da primeira. O nome sob que primeiramente foi designada a espécie de Looss (1899) é *Pronocephalus trigonocephalus;* a confusão de Looss decorre da má interpretação a que se presta a diagnose de Rudolphi dada a sua espécie *Monostoma trigonocephalum* (alias muitas outras espécies têm sido confundidas e referidas como *Monostoma trigonocephalum*); de qualquer forma a descrição e figura apresentadas por Looss são suficientes e correspondem a uma espécie bem definida tipo de um novo gênero. A espécie de Rudolphi não é congenerica, logo, nada impede que o nome específico seja idêntico. Não havia, portanto, necessidade de estabelecer um novo nome para a espécie de Looss (1899) e, de acôrdo com o Art. 25 das Regras Internacionais de Nomenclatura Zoológica o nome correto da espécie tipo do gênero *Pronocephalus* é *Pronocephalus trigonocephalus* Looss, 1899 — As dimensões (comprimento e largura) citadas por Looss em 1901 para *P. obliquus* e em 1902, acompanhadas de um desenho (9,5 e 10 mm. de comprimento por cerca de 1 mm. de largura), não são proporcionais às variações observadas posteriormente por outros autores; nos exemplos mais velhos nota-se uma tendência para o espessamento do corpo e consequente aumento da largura; nunca se observou alongamento como o mencionado por Looss e representado numa boa figura (1902). As figuras e descrição de Oguro (1936), Mehra (1939) e as nossas estão entretanto de acordo com as dadas por Looss em 1899.

Todavia, o fato de ser distinta a espécie observada por Looss em 1901, 1902, da observada em 1899 continúa sendo um ponto discutivel: somente o exame do material original de Looss poderá por um termo à questão. No momento preferimos manter *P. obliquus* na sinonimia de *P. trigonocephalus*.

Pronocephalus minutus, sp. n.

(figs. 12-14)

Habitat: Intestino.
Hospedeiro: Tartaruga marinha (sp. ?).
Distr. Geograf.: Brasil.
Evolução: Desconhecida.

Cricocephalus Looss, 1899

Cricocephalus Looss, 1899 pp. 551, 666, 667.
Cricocephalus Looss, 1901 p. 620.
Cricocephalus Looss, 1902 p. 614, etc.

Diagnose: PRONOCEPHALINAE. Corpo de tamanho médio, alongado; extremidade anterior terminando angulosa e posterior larga e apresentando duas formações papilares contrácteis. Colar cefálico bem evidente. Com uma pequena depressão na face ventral em forma de *V* invertido. Cutícula inerme. Faringe ausente. Esôfago delgado. Cecos longos, passando entre os testículos e apresentando ramificações laterais longas, às vezes com ramificações secundárias. Poro genital situado nas proximidades da bifurcação cecal, desviado da linha mediana. Bolsa do cirro muito desenvolvida e particularmente característica: apresenta a parte prostática nitidamente separada da porção anterior por um estrangulamento; a parte anterior contém um longo ducto ejaculador e um penis bem desenvolvido; a vesicula seminal é tubular e externa, extendendo-se para trás até as proximidades do ovário. Testículos de bordos irregulares, simétricos, com campos bem afastados, situados na parte posterior do corpo. Ovário pretesticular, para-mediano, intracecal. Complexo da glândula da casca atrás e à esquerda do ovário. Vitelinos distribuidos em dois grupos pretesticulares; extracecais, post-equatoriais, de folículos arredondados e numerosos. Útero compreendendo numerosas alças amplas, horizontais, intra e extra-cecais que se extendem desde a zona ovariana até a altura da metade anterior da bolsa do cirro. Vagina muscolosa, bem desenvolvida, apresentando uma parte anterior circundada por numerosas células glandulares e uma posterior, muito mais dilatada, com envoltório glandular pouco acentuado. Ovos numerosos, elipsóides, operculados, com um filamento em cada polo. Poro excretor dorsal, subterminal, mediano. Vesícula excretora curta, bifurcando-se em forma de *Y* logo abaixo da glândula de Mehlis; os troncos coletores principais dirigem-se para a frente e terminam em fundo cego na região cefálica.

Habitat: Aparelho digestivo de quelônios.

Espécie tipo: *Cricocephalus albus* (Kuhl *et* Hasselt, 1822) Looss, 1899.

Cricocephalus albus (Kuhl *et* Hasselt, 1822).

(figs. 20, 21, 25)

Monostomum album Kuhl *et* Hasselt, 1822, *in ref.*

Monostomum trigonocephalum, Diesing, 1850 p. 325, *pro parte.*

Monostomum album, Braun, 1899 pp. 721-724.

Cricocephalus delitescens Looss, 1899 pp. 666, 759, pl. 31, figs. 76-80.

Monostomum album, Braun, 1901 pp. 45-48, figs. 10, 13, 15, 16.

Cricocephalus albus (Kuhl *et* Hasselt) Looss, 1902 p. 532, pl. 25, fig. 64; pl. 32, figs. 170-174.

Cricocephalus delitescens, Linton, 1910 pp. 23-24, pl. 1, figs. 1-3.

Cricocephalus koidzumii Kobayashi, 1920 p. 395, pl. 24, fig. 9.

Habitat: Tubo digestivo.

Hosp.: *Chelone mydas, C. japonica, Caretta caretta, Eretmochelys imbriacata.*

Distr. geogr.: Egipto, Europa (Mediterraneo), Singapura, Japão, Austrália, Estados Unidos e Brasil.

Evolução: Desconhecida.

Cricocephalus ruber (Kuhl et Hasselt, 1822).

Monostomum rubrum Kuhl et Hasselt, 1822 p. 113, *in ref.*

Monostomum trigonocephalum, Diesing, 1850 p. 325, *pro parte.*

Monostomum rubrum Braun, 1901 pp. 50-52, figs. 26-28.

Cricocephalus ruber (Kuhl et Hasselt, 1822) Looss, 1899 p. 762.

Habitat: Estomago.

Hosp.: *Chelone mydas.*

Distr. geogr.: "Iles des Cocotiers".

Evolução: Desconhecida.

Cricocephalus megastomus Looss, 1902

Cricocephalus megastomus Loos. 1902 pp. 533-536, pl. 25, figs. 57-60 pl. 27, fig. 90.

Habitat: Estomago.
Hosp.: *Chelone mydas.*
Distr. geogr.: Egipto.
Evolução: Desconhecida.

Cricocephalus resectus Looss, 1902.

Cricocephalus resectus Looss, 1902 pp. 537-541, pl. 25, figs. 61-63.

Habitat: Estomago.
Hosp.: *Chelone mydas.*
Distr. geogr.: Egipto.
Evolução: Desconhecida.

Pyelosomum Looss, 1899, emend.

Pyelosomum Looss, 1899 p. 667.
Pyelosomum Looss, 1902 p. 613.
Epibathra Looss, 1902 p. 614-615.
Astrorchis Poche, 1925 p. 212.
Myosaccus Gilbert, 1938 pp. 95-98.
Pleurogonius Mehra, 1939, *pro parte.*

Diagnose: PRONOCEPHALINAE. Corpo de tamanho médio. Colar cefálico bem desenvolvido, interrompido na região ventral por uma depressão mediana, formando duas saliências curtas sub-laterais. Cecos de paredes lisas ou formando pequenas saliências saculares, longos, com um trajeto mais ou menos sinuoso, passando entre os testículos e terminando atrás dos mesmos. Poro genital situado no terço anterior do corpo, desviado da linha mediana, extracecal. Bolsa do cirro geralmente pequena, em posição inclinada, contendo cirro, ducto ejaculador e uma parte prostática em geral envolvida por numerosas células glandulares; a vesícula seminal é externa, tubular, longa e circunvoluida. Testiculos volumosos, lobados, situados simetricamente na porção posterior do corpo. Ovário globoso ou lobado, pretesticular, situado ao lado da linha mediana do corpo. Complexo da glândula da casca para ovariana. Vitelinos compostos por dois grupos laterais de foliculos volumosos, extra-cecais, extendendo-se para cima dos testiculos. Útero apresentando numerosas alcas geralmente transversais, preovariano, intra-cecal, terminando numa vagina pouco desenvolvida. Ovos numerosos com um número variável de filamentos, em cada polo. Poro excretor mediano, subterminal, posterior. Vesicula excretora pouco desenvolvida, bifurcando-se em forma

de Y imediatamente atrás da glândula de Mehlis; os ramos da vesícula geralmente acompanham o trajeto dos cecos ao longo das margens do corpo, terminando em fundo cego na região cefálica: apresentam numerosas ramificações laterais às vezes anastomosandas na parte interna com as do ramo oposto.

Habitat: Intestino e bexiga de répteis.

Especie tipo: *Pyclosomum cochlear* Looss, 1899.

Discussão: Looss (1899) creou o gênero *Pyclosomum* para uma nova espécie, *P. cochlear*. Em 1902 estabeleceu o gênero *Epibathra* para a espécie *E. crassa* previamente descrita (1901) sob o nome de *Gylphicephalus crassus*. Comentando o plano geral de organização do grupo friza Looss (1902 p. 609) ..."Ebenso stehen *Epibathra* und *Pyclosomum* einander bis zu einem gewisser grade nahe...". Evidentemente as diferenças mais acentuadas a assinalar entre *Pyclosomum cochlear* e *Epibathra crassa* são:

a) a configuração dos cecos, muito tortuosos na primeira espécie e pouco na segunda.

b) Os ramos da vesícula excretora em *Pyclosomum cochlear* apresentando ramificações laterais porém sem anastomoses internas como em *E. crassa*.

Outras diferenças tais como tamanho da bolsa do cirro, lobulação dos testiculos, etc. são observadas.

Em 1935 Luhman descreveu *Pyclosomum longicaecum*, diferindo da espécie tipo pelo comprimento dos cecos e pela extensão e configuração dos vitelinos.

Em 1936 Oguro descreveu *Pyclosomum posterorchis*. Examinando a diagnose e a figura deste autor verifica-se que a sua espécie tanto pode ser incluida no gênero *Pyclosomum* como no gênero *Epibathra* sendo, aliás, mais proxima de *Epibathra crassa* que das espécies descritas em *Pyclosomum*. Estamos aparentemente em presença de uma espécie intermediaria entre os dois gêneros. Quanto aos detalhes do aparelho excretor Oguro não faz a menor menção. A diferença nesse particular entre as espécies tipo de *Pyclosomum* e *Epibathra* referidas acima, parece ser apenas quantitativa. Conforme já comentou Price (1931 p. 7) "o fato de se unirem ou não os ramos da vesicula na parte anterior ou apresentarem anastomoses ao longo do percurso é um caracter cujo valor generico está, atualmente, na dependência da opinião pessoal e só futuros estudos poderão esclarecer definitivamente o valor de tais caracteres".

Mehra fez ver que os gêneros *Gylphicephelus* e *Barisomum* são sinônimos de *Pleurogonius*.

A morfologia geral deste gênero, *Pyclosomum* e *Epibathra* é a mesma, a única diferença, a nosso ver, consiste em que *Pleurogonius* não apresenta ramificações laterais nos ramos da vesícula. O valor dessa diferença é uma questão discutivel, entretanto, atualmente aceitamos o gênero *Pleurogonius*.

O gênero *Myosaccus* proposto por Gilbert (1938) foi identificado por Mehra (1939) a *Pleurogonius*. A configuração dos cecos de *Myosaccus amblyrhynchus* (espécie tipo) é idêntica à de *Epibathra crassa* e *Pyclosomum posterorchis*; os ramos da vesícula excretora, com suas ramificações laterais só podem ser comparados com os de *Pyclosomum cochlear*.

Consideramos o gênero *Myosaccus* sinônimo de *Pyclosomum*. Da mesma forma identificamos o gênero *Astrorchis* àquele. MacCallum (1921 p. 204) cometnando a posição sistematica de *Monostoma sphargidis* (*M. renicapite* = *Astrorchis renicapite*) diz:

> "This worm, although three time as large as *Pyclosomum coriacea*, will be readilly recognized as belonging to the same genera but of a different species".

Pyclosomum cochlear Looss, 1899.

(fig. 26)

Pyclosomum cochlear Looss, 1899 pp. 667, 773, 774, pl. 31, fig. 83.
Pyclosomum cochlear Looss, 1902 pp. 616, 578, 580. Pl. 27, figs 102-104.
Pyclosomum coriacea ref. in MacCallum, 1921, p. 204.

Habitat: Bexiga.
Hosp.: *Chelone mydas*.
Distr. geograf.: Egipto.
Evolução: Desconhecida.

Pyclosomum crassum (Looss, 1901) n. comb.

Glyphicephalus crassus Looss, 1901 p. 620.
Epibathra crassa (Looss, 1901) Looss, 1902 pp. 575, 578, etc. pl. 26, figs. 83-88.

Habitat: Intestino.
Hosp.: *Caretta caretta*, *Chelone mydas*.
Distr. geograf.: Egipto, Brasil.
Evolução: Desconhecida.

Pyclosomum Longicaecum Luhman, 1935

Pyclosomum longicaecum Luhman, 1935 p. 276, fig. 2.

Habitat: Intestino.
Hosped.: *Caretta caretta.*
Distr. geograf.: Estados Unidos.
Evolução: Desconhecida.

Pyelosomum posterorchis Oguro, 1936

Pyelosomum posterorchis Oguro, 1936, p. 6, fig. 8.

Habitat: Intestino.
Hosped.: *Eretmochelys imbricata.*
Distr. geograf.: Japão.
Evolução: Desconhecida.

Pyelosomum amblyrhynchi (Gilbert, 1938) n. comb.

Myosaccus amblyrhynchi Gilbert, pp. 95-98, pl. 11, figs. 5-8.
Myosaccus = *Pleurogonius* in Mehra, 1939, pp. 122-125.

Habitat: Intestino.
Hosped.: *Amblyrhynchus cristatus* (Lacertilia).
Distr. geograf.: Ilhas Galapagos.
Evolução: Desconhecida.

Pyelosomum renicapite (Leidy, 1856) n. comb.

Monostomum renicapite Leidy, 1856 in ref.
Monostomum nephrocephalum Diesing, 1858 *in ref.*
Monostoma sphargidis Maccallum, 1921, pp. 203-204, fig. 101.
Monostomum renicapite Braun, 1901, pp. 52-54, fig. 25.
Astrorchis renicapite (Leidy), Poche, 1925, p. 212.

Habitat: Intestino.
Hosped.: *Dermochelys coriacea.*
Distr. geograf.: Tunisia, Estados Unidos.
Evolução: Desconhecida.

Adenogaster Looss, 1901

Adenogaster Looss, 1901 pp. 620-621.
Adenogaster Looss, 1902 pp. 570, 583, 591, 601, 603, 609, 612, 615.

Diagnose: PRONOCEPHALINAE. Corpo alongado com extremidade anterior terminando em ponta e a posterior arredondada. Colar cefálico bem desenvolvido, contínuo, com uma depressão ventral em forma de *V* invertido; os lobulos ventro-laterais do colar são curvados em forma)(. Atrás do colar cefálico existe uma cavidade de limites distintos na parte ventral, que se extende até a altura do poro genital; o restante da porção ventral é menos curva e apresenta 4 fileiras longitudinais de glândulas. Cuticula inerme. Faringe ausente. Cecos delgados, longos, passando entre os testículos e terminando atrás destes; apresentam numerosas ramificações sacul formes, curtas, dirigidas no sentido da linha mediana, ao longo da parede interna. Poro genital situado no 1/4 anterior do corpo desviado da linha mediana, intra-cecal. Bolsa do cirro bem desenvolvida, com a parte prostática muito longa e repleta de células glandulares, bem distinta da parte distal que é mais delgada e contem ducto ejaculador e cirro. Vesícula seminal enovelada, externa. Testículos simétricos, de bordos irregulares, situados no 1/3 posterior do corpo. Ovário arredondado, pretesticular, intra-cecal, para-mediano. Complexo da glândula da casca postovariano, mediano. Vitelinos compostos de foliculos volumosos e numerosos, distribuidos em dois grupos laterais, extracecais, pretesticulares. Útero pre-ovariano, intracecal, com alças disseminadas em toda a região mediana do corpo. Vagina musculosa, paralela e externa à bolsa do cirro, rodeada por numerosas células glandulares. Ovos elipsóides, de casca espessa, sem filamento, apresentando uma pequena formação mamilosa num dos polos.

Habitat: Intestino de quelônios marinhos.
Espécie tipo: *Adenogaster serialis* Looss, 1901.

Adenogaster serialis Looss, 1901

(fig. 66)

Adenogaster serialis Looss, 1901 p. 620.
Adenogaster serialis Looss, 1902 pp. 545-548, pl. 26, figs. 71-74.

Habitat: Intestino grosso.
Hosped.: *Caretta caretta*.
Distr. geograf.: Egipto (Mediterrâneo).
Evolução: Desconhecida.

Pleurogonius Looss, 1901 emend.

Pleurogonius Looss, 1901 pp. 567-569.
Pleurogonius Looss, 1902 pp. 603, 609, 610, 612, 616.

Glyphicephalus Looss. 1901 pp. 620-621.
Barisomum Linton. 1910 p. 69.
Himasomum Linton, 1910 p. 71.
Barisomum Price. 1931 p. 7.
Medioporus Oguro, 1936 pp. 14-15.
Pleurogonius Looss, 1901 emend. Mehra, 1939.

Diagnose: PRONOCEPHALINAE. Corpo pequeno ou médio com a extremidade anterior afilada e a posterior arredondada; colar cefálico presente com desenvolvimento variável, contínuo ou não na face dorsal e apresentando uma depressão na ventral. Faringe ausente. Esôfago delgado. Cecos longos, passando entre os testículos e terminando atrás dos mesmos. Poro genital situado no terço anterior do corpo atrás da bifurcação cecal, mediano, submediano ou lateral. Bolsa do cirro variável em posição e desenvolvimento, intra-cecal. Vesícula seminal externa, tubular, enovelada. Testículos irregularmente arredondados, extracecais, situados simetricamente na proximidade do extremo posterior do corpo. Ovário arredondado ou lobado, intracecal, imediatamente pretesticular, à direita da linha mediana. Complexo da glândula da casca postovariano. Canal de Laurer presente. Empermatéca ausente. Vitelinos extracecais pretesticulares. Útero ocupando toda a região mediana do corpo, entre a base da bolsa do cirro e a zona ovariano, intra-cecal na maior parte das espécies. Vagina musculosa, mais ou menos desenvolvida, paralela à bolsa do cirro. Ovos numerosos operculados, geralmente com filamentos polares. Poro excretor sub-terminal, mediano, posterior. Vesícula excretora pouco desenvolvida, a bifurcação dando-se atrás da glândula de Mehlis ou zona testicular; troncos coletores principais paralelos aos cecos e atingindo a região cefálica sem apresentar ramificações ao longo do percurso.

Habitat: Intestino de quelonios e peixes marinhos.
Espécie tipo: *Pleurogonius longiusculus* Looss. 1901.

Discussão: Os caracteres diferenciais entre os gêneros *Pleurogonius* Looss, 1901, *Glyphicephalus* Looss. 1901. *Barisomum* Linton. 1910 (= *Himasomum* Linton. 1910) e *Myosaccus* Gilbert. 1938, foram discutidos por Mehra (1939) que concluiu pela sinonimia dos mesmos. Aceitamos a conclusão de Mehra com referência aos três primeiros: o gênero *Myosaccus*, em nossa opinião, de fato, não deve prevalecer. *Myosaccus amblyrhynchi* (sp. tipo) apresenta muita similaridade com as espécies do gênero *Pyelosomum*. A configuração dos cecos e a morfologia em geral é idêntica à de *Pyelosomum posterorchis* Oguro. 1936 e *Epibathra crassa* Looss, 1902. Os detalhes do aparelho excretor são, particularmente muito semelhantes aos observados em *Pyelosomum cochlear*. A presença

de numerosos filamentos polares nos ovos é um caracter que igualmente aproxima *Myosaccus* de *Pyelosomum* e o afasta de *Pleurogonius*, embora este caracter isolado não possa ser considerado decisivo como genérico. Os demais caracteres descritos por Gilbert podem perfeitamente ser considerados especificos.

Oguro (1936) propôs o gênero *Medioporus* tendo *M. macrophallus* "n. sp." como tipo e incluiu uma segunda espécie, também nova *M. cheloniae*.

O gênero proposto por Oguro é diferenciado nos seguintes termos originais:

"Diese Gattung ist in Bezung auf den medianen Genitalporus *Opisthoporus* ähnlich, aber:

1 — Das die Hoden im Hinterende symmetrich neben einander liegen, lässt diese Gattung von *Opisthoporus* unterscheiden.

2 — Dadurch, dass der Schalendrüsen Komplex hinter dem Keimstock liegt, und das die Enden der Darmschenkel sich nicht verbinden, ist *Medioporus* ganz verschieden von *Hippocrepis*.

3 — Der Keimstock ligt je dochrechtsseitig. Also ist *Medioporus* deutlich ein Angesöriger der Unterfamilie PRONOCEPHALINAE und steht in enger Verwandtsschft mit *Glyphicephalus* oder *Epibathra*. Doch lagerund und Grösse des Kopulationsorgans machen einen Unterschied zwischen ihnem. Zu meinem Bedauren ist der Excretionsapparat nicht eingehend beobachtet worden".

Em vista de Oguro não haver observado os detalhes do aparelho excretor torna-se mais difícil distinguir *Medioporus* de *Pyelosomum* (= *Epibathra*) de um lado e *Pleurogonius* (= *Glyphicephalus* e *Barisomum*) de outro; em nossa opinião é mais chegado a este último do qual aliás não pode ser diferenciado. É noção geral que o poro genital neste gênero ocupa uma posição lateral, aliás esse caracter já foi considerado como caracteristico dos PRONOCEPHALIDAE sensu Looss. Em nota anterior (1944) já comentamos a respeito de tal concepção quanto à familia. Quanto ao gênero *Pleurogonius* aceitamos atualmente uma diagnose modificada; nestas condições verificamos que o poro genital localiza-se em posições variáveis dentro dos limites de uma determinada zona, podendo ser mediano, para-mediano ou quasi totalmente lateral, conforme poderá ser apreciado no esquema apresentado na fig. 27. Esta observação contradiz a nossa própria afirmativa (1944 p. 221) que "o desvio do poro genital da linha mediana constitue um bom caracter genérico", pois no caso atual não pode esse caracter ser levado em linha de conta sinão com valor especifico.

O gênero *Medioporus* é pois considerado sinônimo de *Pleurogonius* e as espécies descritas por Oguro passarão a ser referidas sob esta nova combinação.

Pleurogonius longiusculus (v. Beneden, 1859) Looss, 1901
(fig. 30-34)

Monostomum trigonocephalum Van Beneden, 1859 p. 8, pl. 2, fig. 5 *nec* Rudolphi 1809 ref. in Looss.

Monotomum trigonocephalum Walter, 1892 p. 191 *nec* Rudolphi, 1809, ref. in Looss.

Pleurogonius longiusculus Looss, 1901 p. 568.
Pleurogonius longiusculus Looss, 1902 p. 558, pl. 27, figs. 94, 98; pl. 32, figs. 176-177.

Habitat: Intestino.
Hosped.: *Chelone mydas*.
Distr. geogr.: Egipto (Mediterrâneo) Brasil.
Evolução: Desconhecida.

Pleurogonius trigonocephalus (Rudolphi, 1809)

Planaria mydae Braun, *in literis ad* Rudolphium.
Monostoma trigonocephalum Rudolphi, 1809 p. 336.
Monostoma trigonocephalum, 1819 p. 349.
Monostomum trigonocephalum Braun, 1901 pp. 38-45, pl. 2, fig. 29
Pleurogonius trigonocephalus (Rud.) Looss, 1901 p. 567.
Pleurogonius trigonocephalus (Rud.) Looss, 1902 p. 548, pl. 26, figs. 75-78.

Habita: Tubo digestivo.
Hosp.: *Eretmochelys corticata, Caretta caretta*.
Distr. geogr.: Costa do Mediterrâneo, Austrália, Estados Unidos, Brasil.
Evolução: Desconhecida.

Pleurogonius bilobus Looss, 1901

Pleurogonius bilobus Looss, 1901 p. 569.
Pleurogonius bilobus Looss, 1902 p. 567 pl. 27, fig. 100.

Habitat: Intestino.
Hosp.: *Chelone mydas*.
Distr. geogr.: Egipto (Mediterrâneo).
Evolução: Desconhecida.

Pleurogonius linearis Looss. 1901

Pleurogonius linearis Looss, 1901 p. 618.
Pleurogonius linearis Looss, 1902 p. 565, pl. 27, fig. 99.
Pleurogonius linearis Oguro, 1936 p. 8, figs. 9, 10.

Habitat: Intestino.
Hosp.: *Chelone mydas, C. japonica.*
Distr. geogr.: Egipto (Mediterrâneo), Japão e Brasil.
Evolução: Desconhecida.

Pleurogonius minutissimus Looss, 1901

Pleurogonius minutissimus Looss, 1901 p. 618.
Pleurogonius minutissimus Looss, 1902 p. 568, pl. 27, fig. 101.

Habitat: Intestino.
Hosp.: *Chelone mydas.*
Distr. geogr.: Egipto (Mediterrâneo).
Evolução: Desconhecida.

Pleurogonius solidus (Looss, 1901).

Glyphicephalus solidus Looss, 1901 p. 619.
Glyphicephalus solidus Looss, 1902 p. 571, pl. 26, figs. 79-80; pl. 27, figs. 92, 93; pl. 32, fig. 178.

Habitat: Intestino.
Hosp.: *Chelone mydas.*
Distr. geogr.: Egipto (Mediterrâneo).
Evolução: Desconhecida.

Pleurogonius lobatus (Looss, 1901).

Glyphicephalus lobatus Looss, 1901 p. 619.
Glyphicephalus lobatus Looss, 1902, p. 573, pl. 26, figs. 81, 82; pl. 27, fig. 91.
Glyphicephalus lobatus Oguro, 1936 p. 14, fig. 14.

Habitat: Intestino.
Hosp.: *Chelone mydas, Eretmochelys imbricata.*
Distr. geogr.: Egito (Mediterrâneo), Japão, Brasil.
Evolução: Desconhecida.

Pleurogonius erubescens (Linton, 1910).

Barisomum erubescens Linton, 1910 pp. 69-71, pl. 21, figs. 173-177; pl. 22, figs. 178-183.

Habitat: Intestino.

Hosp.: *Angelichthys isabelita, Pomacanthus arcuatus, Scarus croicensis* (Pisces).

Distr. geogr.: Estados Unidos.

Evolução: Desconhecida.

Pleurogonius candidulus (Linton, 1910).

Himasomum candidulum Linton, 1910 pp. 71-72, pl. 22, figs. 184-184a, pl. 23, figs. 185-196, pl. 23, figs. 197-197a.

Barisomum candidulum (Linton) Price, 1937 p. 7.

Habitat: Intestino.

Hosp.: *Angelichthys isabelita, Pomacanthus arcuatus* (*Pisces*).

Distr. geogr.: Estados Unidos.

Evolução: Desconhecida.

Pleurogonius ozakii Oguro, 1936

Pleurogonius ozakii Oguro, 1936 pp. 10-14, figs. 11-13.

Habitat: Intestino.

Hosp.: *Eretmochelys imbricata.*

Distr. geogr.: Japão.

Evolução: Desconhecida.

Pleurogonius macrophallus (Oguro, 1936) n. comb.

Medioporus macrophallus Oguro, 1936 pp. 16-18, fig. 15.

Habitat: Não mencionado.

Hosp.: *Eretmochelys imbricata.*

Distr. geogr.: Japão.

Evolução: Desconhecida.

Pleurogonius Cheloniae (Oguro, 1936) n. comb.

Medioporus cheloniae Oguro, 1936 pp. 18-20, fig. 16.

Habitat: Não mencionado.
Hosp.: *Chelone japônica.*
Distr. geogr.: Japão.
Evolução: Desconhecida.

Pleurogonius karachii Mehra, 1939

Pleurogonius karachii Mehra, 1939 pp. 109-112, fig. 6.

Habitat: Intestino delgado.
Hosp.: *Chelone mydas.*
Distr. geogr.: India.
Evolução: Desconhecida.

Pleurogonius sindhii Mehra, 1939

Pleurogonius sindhii Mehra, 1939 pp. 113-116, fig. 7.

Habitat: Intestino delgado.
Hosp.: *Chelone mydas.*
Distr. geogr. India:
Evolução: Desconhecida.

Pleurogonius mehrai (Mehra, 1939) sp. nom. n

Pleurogonius chelonii Mehra, 1939 pp. 116-119, figs. 8-9.

Habitat: Intestino delgado.
Hosp.: *Chelone mydas.*
Distr. geogr.: India.
Evolução: Desconhecida.

Observação: Transferidas para *Pleurogonius* as espécies descritas por Oguro (1936) no gênero *Medioporus*, resulta que a denominação *cheloniae* daquele autor e *chelonii* de Mehra (1939) não podem coexistir. De acordo com o Art. 35 das Leis de Nomenclatura Zoológica devem ser considerados homônimos, por apresentar "a mesma origem e significação" e por "se distinguirem apenas pela terminação". Nestas condições o nome mais recente não pode prevalecer; para a espécie de Mehra propomos o *n. nom* *Pleurogonius mehrai*.

Pleurogonius keamarii Mehra, 1939

Pleurogonius keamarii Mehra, 1939 pp. 119-122, fig. 10.

Habitat: Intestino delgado.
Hosp.: *Chelone mydas.*
Distr. geogr.: India.
Evolução: Desconhecida.

Teloporia Fukui, 1933

Paramphistomum MacCallum, 1917 p. 57, *nec* Fischoeder, 1901.
Opisthoporus Fukui, 1929 p. 339, *nec* Benson, 1851.
Teloporia Fukui, 1933 p. 332.

Diagnose: PRONOCEPHALINAE. Corpo alongado com a extremidade anterior arredondada e a posterior adelgaçando-se bruscamente numa ponta coniforme. Cutícula lisa. Colar cefálico presente. Ventosa oral sub-terminal, muito desenvolvida. Faringe ausente. Esôfago delgado. Cecos longos sem divertículos laterais. Poro genital na linha mediana do corpo, no terço anterior, post-bifurcal. Bolsa do cirro desenvolvida, dirigida verticalmente, com cirro espinhoso. Testículos globóides situados na porção posterior do corpo, com campos coincidentes e zonas contíguas. Ovário prétesticular, sub-mediano. Vitelinos constituidos por dois grupos laterais e extracecais de foliculos volumosos que se extendem desde a zona ovariana até o nivel da base da vagina. Útero constituido por numerosas alças ocupando a parte média do corpo, pré-ovariano e principalmente intracecal. Vagina musculosa, paralela à bolsa do cirro. Ovos com um longo filamento em cada polo. Poro excretor mediano e terminal.

Habitat: Oviducto e intestino de quelônios.
Espécie tipo: *Teloporia aspidonectes* (MacCallum, 1917) Fukui, 1933.

Teloporia aspidonectes (MacCallum, 1917), Fukui, 1933

(fig. 69)

Paramphistomum aspidonectes MacCallum, 1917 p. 59 *in ref.*
Opisthoporus aspidonectes (MacCallum) Fukui, 1929 p. 339.
Opisthoporus aspidonectes (MacCallum), Stunkard, 1930 p. 210 etc. pl. XXV.
Opisthoporus aspidonectes (MacCallum), Price, 1931 pp. 3-5, fig. 2.
Teloporia aspidonectes (MacCallum), Fukui, 1933 p. 332.

Habitat: Oviducto e intestino.

Hosp.: *Amyda ferox*, *Amyda spinifera*.

Distr. geogr.: Estados Unidos.

Evolução: Desconhecida.

Iguanacola Gilbert, 1938

Iguanacola Gilbert, 1938 p. 94.

Diagnose: PRONOCEPHALINAE de talhe médio, corpo alongado com a extremidade anterior afilada e a posterior arredondada. Colar cefálico presente, interrompido ventralmente por uma depressão oval. Ventosa oral sub-terminal. Faringe ausente. Esôfago curto. Cecos longos, passando entre os testículos em forma de)(e terminando atrás destes. Poro genital à direita da linha mediana, no terço médio do corpo. Testículos lobados, situados simètricamente na parte posterior do corpo. Bolsa do cirro bem desenvolvida dividida em duas porções por uma constricção; contem cirro, ducto ejaculador e parte prostática. Vesícula seminal tubular, circunvoluida, externa. Ovário pretesticular, mediano. Complexo da glândula da casca posterior ao ovário. Canal de Laurer presente. Espermateca ausente. Vitelinos constituidos por folículos volumosos distribuidos em dois campos extracecais, desde a zona testicular até as proximidades da linha equatorial. Útero com alças amplas, horizontais, intra e extracecais, preovarianas e postequatoriais. Vagina paralela à bolsa do cirro. Ovos com um longo filamento em cada polo. Poro excretor subterminal, mediano, posterior. Vesícula excretora bifurcando-se na parte anterior da zona testicular em forma de Y; os troncos coletores principais apresentam numerosas anastomoses internas, como em *Pyclosomum crassum* (Looss).

Habitat: Intestino de Iguanideo marinho.

Espécie tipo: *Iguanacola navicularis* Gilbert, 1938.

Iguanacola navicularis Gilbert, 1938

(figs. 71-73)

Iguanacola navicularis Gilbert, 1938 pp. 91-95, pl. 11, figs. 1-4.

Habitat: Intestino.

Hosp.: *Amblyrhynchus cristatus*.

Distr. geogr.: Ilhas Galapagos.

Evolução: Desconhecida.

Renigonius Mehra, 1939

Renigonius Mehra, 1939 p. 129.

Diagnose: PRONOCEPHALINAE de pequeno talhe; extremidades ligeiramente cônicas sendo a anterior mais delgada. Colar cefálico presente, contínuo dorsal e ventralmente. Faringe ausente. Esôfago delgado e longo. Cecos largos, longos e convergentes, terminando na parte média da zona testicular. Poro genital lateral, pré-bifurcal. Testículos alongados e reniformes, com lobulação discreta, situados inclinadamente em forma de V na parte posterior do corpo. Bolsa do cirro muito pequena, tubular, situada à esquerda da linha mediana, mórmente extracecal. Vesícula seminal externa, tubular. Ovário arredondado pretesticular, à direita da linha mediana. Complexo da glândula da casca mediano e um pouco abaixo do ovário. Espermatéca ausente. Vitelinos formados por dois grupos extracecais de folículos volumosos que se extendem para a frente da zona testicular e atingem a linha equatorial. Útero constituido por numerosas alças transversais que enchem todo o espaço intracecal até a bifurcação. Vagina tubular paralela à bolsa do cirro e à esquerda desta. Ovos numerosos (filamentos polares não observados) (Mehra cit.).

Habitat: Estomago de quelônio d'água doce.

Espécie tipo: *Renigonius orientalis* Mehra, 1939.

Renigonius orientalis Mehra, 1939

(fig. 70)

Renigonius orientalis Mehra, 1939 pp. 125-129, fig. 11.

Habitat: Estomago.

Hosp.: *Kachuga dhongoka*.

Distr. geogr.: India.

Evolução: Desconhecida.

Sub-família NOTOCOTYLINAE Kossack, 1911 emend.

NOTOCOTYLIDAE Luehe, 1909 p. 31.

NOTOCOTYLIDAE Luehe, 1909 emend. Yamaguti, 1933 p. 51.

NOTOCOTYLIDAE Luehe, 1909 emend. Harwood, 1939 p. 333.

OGMOGASTERINAE Kossack, 1911 p. 564.

OGMOCOTYLINAE Skrjabin & Schulz. 1933 p. 270.
CYMBIFORMINAE Yamaguti. 1933 p. 101.
CYMBIFORMINAE Yamaguti. 1933 emend. Bhalerao. 1936 p. 136.

Diagnose: PRONOCEPHALIDAE. Corpo de tamanho médio ou pequeno. com a superfície ventral apresentando ou não numerosas glândulas dispostas em fileiras ou cristas longitudinais. Colar cefálico ausente; extremidade posterior arredondada e lisa. Poro genital mediano ou lateral, situado na metade anterior do corpo. Testiculos em número de dois, situados na extremidade posterior do corpo ou proximidades. Ovário na zona testicular. Complexo da glândula da casca usualmente situado acima do ovário. Útero intracecal podendo apresentar alças cecais e extracecais, na região mediana do corpo. Vitelinos constituidos por dois grupos de foliculos que se extendem para cima da zona testicular. Ovos numerosos com filamentos polares. Parasitos de aves e mamiferos.
Gênero tipo: *Notocotylus* Diesing, 1839.

Nesta sub-familia consideramos sete gêneros válidos à luz dos atuais conhecimentos, que podem ser separados pela seguinte chave:

1 — Poro genital situado entre a linha mediana e o bordo lateral do corpo ...... *Ogmocotyle* Skrj. & Schulz, 1933

Poro genital situado sobre a linha mediana do corpo 2

2 — Parte posterior dos vitelinos margeando os testiculos externamente em toda a sua extensão ....*Hofmonostomum* Harwood, 1939

Vitelinos se extendendo para a frente da zona testicular 3

3 — Superfície ventral sem formações glandulares ou cristas .... *Paramonostomum* Luehe, 1909

Superfície ventral apresentando formações glandulares ou cristas longitudinais 4

4 — Numerosas rugas ou cristas (13 a 17) dispostas em fileiras paralelas, longitudinais, na face ventral ....*Ogmogaster* Jägerskiöld, 1891

Três ou cinco fileiras glandulares dispostas paralelamente na superfície ventral 5

5 — Glandulas ventrais dispostas em cinco fileiras .... *Quinqueserialis* Skvortsow, 1935 emend. Harwood, 1939

Glândulas ventrais dispostas em três fileiras 6

6 — Glândulas ventrais numerosas, isoladas nas três fileiras .... *Notocotylus* Diesing, 1839

Glândulas das fileiras laterais isoladas e as medianas soldadas e formando uma crista continua ....*Catatropis* Odhner, 1905.

Notocotylus Diesing. 1839

Notocotylus Diesing, 1839, *in ref.*
Notocotyle Diesing, 1850 p. 411.
Hindia Lal, 1935 p. 461, *in ref.*
Naviformia Lal, 1935 p. 461, *in ref.*
Kossackia U. Szidat, 1936 p. 235.

Diagnose: NOTOCOTYLINAE; corpo alongado com a extremidade anterior mais delgada e a posterior largamente arredondada. Tegumento liso. Colar cefálico ausente. Superfície externa apresentando três fileiras de glândulas isoladas na face ventrar. Faringe ausente. Esôfago delgado. Cecos longos passando entre os testículos. Poro genital mediano localisado nas proximidades da bifurcação cecal. Bolsa do cirro desenvolvida, dirigida no sentido longitudinal, contendo cirro, ducto ejaculador e parte prostática envolta por numerosas células glandulares. Vesícula seminal tubular, enovelada, externa. Testículos geralmente lobados, simétricos, situados na porção posterior do corpo. Ovário mediano, na zona testicular. Complexo da glândula da casca pré-ovariano. Espermatéca ausente. Vitelinos constituidos por folículos volumosos dispostos em dois grupos laterais acima da zona testicular. Útero pré-ovariano, na região mediana e intracecal. Vagina musculosa, tubular, paralela à bolsa do cirro. Ovos numerosos, elipsóides e apresentando um longo filamento em cada polo. Poro excretor mediano, posterior. Vesícula excretora curta bifurcando-se em forma de Y; os ramos dirigem-se para a frente, margeando os campos cecais, e unem-se na região cefálica.

Habitat: Tracto intestinal de aves.
Espécie tipo: *Notocotylus attenuatus* (Rudolphi, 1809) Kossack, 1911.

Observação: Lal em 1935 subdividiu o gênero *Notocotylus* estabelecendo o o gênero *Hindia* tendo *Notocotylus gibbus* (Mehlis in Creplin, 1846) como tipo e *Naviformia* com a espécie tipo, *Notocotylus naviformis* Tubanqui, 1932. U. Szidat em 1936 creou o gênero *Kossackia*, espécie tipo, *Notocotylus gibbus* (Mehlis in Creplin, 1-846) incluindo mais a espécie *Notocotylus pacifera* (Noble, 1933).

Em 1939 Harwood fez ver que a ereção desses gêneros não se funda em bases seguras; os caracteres levados em linha de conta, tais como a situação do poro genital, forma do corpo, iretractibilidade das glândulas ventrais e hospedeiro, são insuficientes para a separação de gêneros distintos.

Notocotylus attenuatus (Rudolphi, 1809) Kossack, 1911

(fig. 79)

Monostoma attenuatum Rudolphi, 1809 pp. 328-329.

Monostoma attenuatum Rudolphi, 1919 p. 84.

Monostomum attenuatum Diesing, 1850 pp. 322-333.

Notocotylus triserialis Diesing, 1839 *in ref.*

Notocotyle triseriale Diesing, 1850 pp. 411-412.

Notocotyle triserialis, Lühe, 1909 p. 32.

Notocotylus attenuatus (Rud.) Kossack, 1911 p. 555.

Cercaria vaga Szidat & Szidat, 1933 pp. 414-415 fig. 16.

Notocotyla attenuata Ishii, 1933 pp. 91-93, fig. 8.

Notocotylus urbanensis Lutermoser, 1935 p. 456, *nec* Cort, 1914, *nec* Harrah, 1922.

Habitat: Tracto intestinal.

Hosp.: *Mergus merganser*, *Anser fabalis*, *Anas platyrhynchos*, *Mareca penelope*, *Nettion crecca*, *Dafila acuta*, *Clangula hyemalis*, *Tadorna tadorna*, *Spatula clypeata*, *Somateria mollissima*, *Querquedula querquedula*, *Nyroca fuligula*, *Nyroca ferina*, *Oidemia fusca*, *Anas superciliosa*, *Branta canadensis*, *Olor bewicki jankowskii*, *Anas poicilorynchа zonorhyncha*, etc.

Evolução: O ciclo evolutivo desta espécie foi estabelecido por Joyeux (1922) (?), Mathias (1930, L. e U. Szidat (1933) e Yamaguti (1938). Os seguintes hospedeiros intermediários foram assinalados: *Planorbis rotundatus*, segundo Joyeux, *Lymnaea limosa*, segundo Mathias, *Lymnaea palustris*, segundo L. e U. Szidat, todos da Europa, e Bulimus striatus japonicus, segundo Yamaguti, do Japão. O ciclo estabelecido por Joyeux discorda dos demais em vários aspectos: Mathias examinou os exemplares adultos obtidos experimentalmente por aquele autor chegando à conclusão que "constituem uma espécie próxima porém distinta de *Notocotylus attenuatus*".

Notocotylus aegyptiacus (Looss, 1896) Odhner, 1905

Monostomum verrucosum Looss, 1896 *nec* Froelich, 1789, *nec* Odhner 1905 *in ref.*

Notocotyle aegyptiaca Odhner, 1905, *in ref.*

Notocotylus aegyptiacus, Kossack, 1911 p. 558.

Habitat: Intestino.
Hosp.: *Anas platyrhynchos.*
Distr. geogr.: Egipto.
Evolução: Desconhecida.

Notocotylus gibbus (Mehlis, *in* Creplin, 1846) Kossack, 1911

Monostomum gibbum Mehlis, *in* Creplin, 1946 p. 137.
Notocotylus gibbus (Mehlis) Kossack, 1911 p. 557, pl. 14, fig. 18.
Catatropis verrucosa Baylis, 1928 p. 331, *nec* Froelich, 1789 *nec* Odhner, 1905.
Hindia gibbus Lal, 1935, *in ref.*
Kossackis gibba Szidat, 1936 p. 235.

Habitat: Tracto intestinal.
Hosp.: *Gallinula chloropus, Fulica atra, Anas platyrhynchos.*
Distr. geogr.: Europa, America do Norte.
Evolução: Desconhecida.

Observação: Segundo Harwood (1939) a espécie descrita por Stunkard & Dunihue (1931) como *Notocotylus gibbus* identifica-se a *Notocotylus imbricatus* (Looss, 1893) Szidat, 1935.

Notocotylus Scincti Fuhrmann, 1919

Notocotylus scincti Fuhrmann, 1919 p. 35, pl. V, *in. ref.*
Notocotylus scincti Fuhrmann, 1928 p. 123, fig. 161.
Notocotylus scincti Fuhrmann, 1928 *in* Szidat & Szidat, 1933 p. 411.
Notocotylus scincti Fuhrmann, 1919 *in* Gower, 1939 p. 596.

Habitat: Intestino.
Hosp.: *Querquedula querquedula, Anas platyrhynchos.*
Distr. geogr.: Europa.
Evolução: As formas larvárias desta espécie ocorrem em *Limnaea peregra* e *Physa fontinalis*, na Inglaterra, segundo Harper (1929).
Observação: Harwood identifica esta espécie a *N. imbricatus.*

Notocotylus Noyeri Joyeux, 1922

Notocotylus noyeri Joyeux, 1922 p. 338, figs. 8-9, *in ref.*

Habitat: Intestino.
Hosp.: *Arvicola amphibius.*

Distr. geogr.: Europa.

Evolução: Desconhecida.

Notocotylus urbanensis (Cort, 1914) Harrah, 1922

Cercaria urbanensis Cort, 1914 p. 65.

Notocotylus urbanensis (Cort, 1914) Harrah, 1922 pp. 51-53, pl. V figs 12, 14, 17, 18, 19.

Habitat: Intestino.

Hosp.: *Ondrata zibethica, Aix sponsa, Dafila acuta* (seg. Harrah).

Distr. geogr.: Estados Unidos.

Evolução: O ciclo evolutivo desta espécie, aliás duvidosa, não foi estabelecido claramente. *Cercaria urbanensis* foi encontrada em *Physa gyrina* (Cort. orig.).

Observação: Lutermoser (1935) pensou haver demonstrado experimentalmente que *Cercaria urbanensis* é a forma larvaria de *Notocotylus urbanensis* "confirmando as suposições de Harrah". Harwood (1939) faz ver que os exemplares de Lutermoser, obtidos experimentalmente, são na realidade a espécie *Notocotylus attenuatus*. Este autor não aceita a denominação "*urbanensis*" como válida para formas adultas acrescentando: ... One of Harrah's figure suggests *Notocotylus attenuatus*, rather than *N. imbricatus*".

Notocotylus chionis Baylis, 1928

Notocotylus chionis Baylis, 1928 pp. 582-585, figs. 1, 2.

Habitat: Intestino.

Hosp.: *Chionis alba*.

Distr. geogr.: Patagônia.

Evolução: Desconhecida.

Notocotylus tachyeretis Duthoit, 1931

Notocotylus tachyeretis Duthoit, 1931 p. 290, fig. 1.

Habitat: Intestino delgado e ceco.

Hosp.: *Tachyeretis patachonicus*.

Distr. geogr.: Patagônia.

Evolução: Desconhecida.

Notocotylus intestinalis Tubangui, 1932

Notocotylus intestinalis Tubangui. pp. 371-373. pl. i. figs. 1, 2.

Habitat: Intestino.
Hosp.: *Anas platyrhynchos* (dom.).
Distr. geogr.: Filipinas.
Evolução: Desconhecida.
Observação: Harwood (1939) coloca esta espécie na sinonimia de *Notocotylus imbricatus*.

Notocotylus naviformis Tubangui, 1932

Notocotylus naviformis Tubangui, 1932 pp. 373-374, pl. i, figs. 2, 3.
Naviformia naviformis Lal, 1935 p. 461. *in ref.*

Habitat: Intestino.
Hosp.: *Anas platyrhynchos* (dom.).
Distr. geogr.: Filipinas.
Evolução: Desconhecida.

Notocotylus parviovatus Yamaguti, 1934

Notocotylus parviovatus Yamaguti, 1934 pp. 558-559. fig. 6.

Habitat: Cecos.
Hosp.: *Anser albifrons albifrons, Aix galericulata, Cygnus bewickii jankowskii, Metanonyx fabalis serrirostris.*
Distr. geogr.: Japão:
Evolução: Desconhecida.

Notocotylus magniovatus Yamaguti, 1934

Notocotylus magniovatus Yamaguti, 1934 pp. 559-561. fig. 7.
Notocotylus attenuatus Cannon, 1938 p. 279. fig. 9. *nec* Rud., 1809.
Notocotylus urbanensis Gower, 1938*nec* Harrah. 1922.
Notocotylus magniovatus Yamaguti, 1938 p. 290 pp., figs. 4, 5, 7.

Habitat: Ceco.
Hosp.: *Anser alb. albifrons, Chen hyperborea, Querquedula discors, Glaucionetta islandica, Anas platyrhynchos platyrhynchos, Metanonyx fabalis serrirostris, Aix galericulata.*

Distr. geogr.: Japão, Canadá, Estados Unidos.

Evolução: O ciclo biológico foi estabelecido por Yamaguti (1938), no Japão: hospedeiro intermediário, *Semisulcospira libertina*.

Observação: Bhalerao (1935) considerou esta espécie idêntica a *N. attenuatus*; o estudo das fazes larvárias (Yamaguti, 1938) mostrou ser inaceitável a opinião daquele autor.

Notocotylus Babai Bhalerao, 1935

Notocotylus babai Bhalerao, 1935 pp. 1-5, fig. 1.

Habitat: Ceco.
Hosp.: *Milvus migrans govinda*.
Distr. geogr.: India.
Evolução: Desconhecida.

Notocotylus imbricatus (Looss, 1893) Szidat, 1935

Cercaria imbricata Looss, 1823, *in ref.*
Notocotylus gibbus Stunkard & Dunihue, 1931, *nec* Mehlis, *in* Creplin, 1846

Notocotylus imbricatus U. Szidat, 1935 pp. 268-270, figs. 1 a, b, 2 a, b, c, 3, 4, 5 a, b.

Habitat: Intestino.
Hosp.: "Pato" (sp.) Experimental.
Distr. geogr.: Europa, Estados Unidos.

Evolução: Formas larvárias em *Bithynia tentaculata*, segundo Szidat, *loc. cit.*, que estabeleceu o ciclo evolutivo. Segundo Harwood a espécie *N. gibbus* de Stunkard & Dunihue é sinônima de *N. imbricatus*.

Notocotylus linearis (Rud. 1819-?) Szidat, 1936

(?) *Monostoma lineare* Rudolphi, 1819 pp. 83, 343, 344.
Notocotylus linearis (Rud.?) Szidat, 1936 pp. 231-235, figs. 1, 3.

Habitat: Cecos.
Hosp.: *Vanellus vanellus*.
Distr. geogr.: Europa.
Evolução: Desconhecida.

Notocotylus ralli Baylis, 1936

Notocotylus ralli Baylis, 1936 pp. 474-477, 1 fig.

Habitat: Cecos e reto.
Hosp.: *Rallus aquaticus.*
Distr. geogr.: Inglaterra.
Evolução: Desconhecida.

Notocotylus orientalis Ku, 1937

Notocotylus orientalis Ku, 1937 pp. 113-116, fig. 1.

Habitat: Intestino (cecos).
Hosp.: *Melanonyx fabalis serrirostris.*
Distr. geogr.: China.
Evolução: Desconhecida.
Observação: No trabalho de Harwood (1939) esta espécie figura na sinonímia de *N. parviovatus* (p. 423) e de *N. imbricatus* (p. 425).

Notocotylus anatis Ku, 1937

Notocotylus anatis Ku, 1937 pp. 116-118, figs. 2, 3.

Habitat: Intestino.
Hosp.: *Anas domestica var. pekinensis.* (cit. orig.).
Distr. geogr.: China.
Evolução: Desconhecida.
Observação: Esta espécie consta na sinonímia de *N. imbricatus in* Harwood (1939); evidentemente trata-se de um engano.

Notocotylus pacifera (Noble, 1933) Harwood, 1939

Catatropis pacifera Noble, 1933 pp. 353-356, figs. 4-7.
Notocotylus gibbus Szidat & Szidat, 1933 pp. 419-421, figs. 11-12 *nec* Mehlis, *in* Crepiin, 1846, *nec* Kossack, 1911.
Kossackia pacifera U. Szidat, 1936 p. 235.
Catatropis pacifera Yamaguti, 1939 p. 137, pl. XV, fig. 10.
Paramonostomum obtortum Caballero y C. 1942 pp. 91-94 figs. 1, 2.

Habitat: Cecos.
Hosp.: *Fulica americana, Fulica atra atra, Querquedula discors.*

Distr. geogr.: Estados Unidos, México, Japão, (Europa?).

Evolução: Desconhecida.

Observação: Segundo Harwood (1939), "não há diferença importante entre as especimens descritos como *N. gibbus* por Szidat & Szidat, 1933 e a espécie descrita por Nobre, e o nome *gibbus* não é aceito para esta espécie porque os exemplares descritos na Europa e nos Estados Unidos, pelos autores referidos acima, possuem apenas 4 glândulas na fileira mediana, número menor que o assinalado para *N. gibbus* por Kossack (1911)." — Segundo Yamaguti (1939) a validês desta espécie é duvidosa sugerindo "que seria muito desejável reexaminar a espécie descrita por Johnston (1929), *Catatropis gallinulae*, e verificar se de fato não existem glândulas na fileira mediana". Achamos razoável a advertência de Yamaguti e prevemos que surgirá uma modificação se for feita uma revisão das três espécies: *N. gibbus*, *N. gallinulae* e *N. pacifera*. Segundo Larios (1943), *Paramonostomum obtortum* Caballero y C. 1942 é idêntica a *N. pacifera*.

Notocotylus porzanae Harwood, 1939

Notocotylus porzanae Harwood, 1939 p. 424, pl. 1, fig. 4.

Habitat: Cecos.

Hosp.: *Porzana carolina*.

Distr. geogr.: Estados Unidos.

Evolução: Desconhecida.

Notocotylus regis Harwood, 1939

Notocotylus regis Harwood, 1939 p. 424, pl. 1, fig. 5.

Habitat: Cecos.

Hosp.: *Rallus elegans*.

Distr. geogr.: Estados Unidos.

Evolução: Desconhecida.

Notocotylus filamentis (Barker, 1915) Harwood, 1939

Catatropis filamentis Barker, 1915 pp. 184-197, pl. i, fig. 6.
Catatropis fimbriata Barker, 1915 p. 190.
Notocotylus filamentis (Barker, 1915) Harwood, 1939 p. 425.

Habitat: Intestino.

Hosp.: *Ondrata zibethica*.

Distr. geogr.: Estados Unidos.
Evolução: Desconhecida.

Notocotylus dafilae Harwood, 1939

Notocotylus dafilae Harwood, 1939 p. 428, pl. 1, figs. 6, 7.

Habitat: Cecos.
Hosp.: *Dafila acuta.*
Distr. geogr.: Estados Unidos.
Evolução: Desconhecida.

Notocotylus micropalmae Harwood, 1939

Notocotylus micropalmae Harwood, 1939 p. 429, pl. 1, figs. 8, 9.

Habitat: Intestino (?).
Hosp.: *Micropalma himantopus.*
Distr. geogr.: Estados Unidos.
Evolução: Desconhecida.

Notocotylus ephemera (Nitzsch, 1807) Harwood, 1939

Cercaria ephemera Nitzsch, 1907 *nec* Lebour, 1907, *in ref.*
Notocotylus thienemanni Szidat & Szidat, 1933 pp. 413-417, figs, 9, 10.
Notocotylus thienemanni Szidat, 1935 pp. 265-267, fig. 5d.
Notocotylus ephemera (Nitz.) Harwood, 1939 p. 422.

Habitat: Intestino.
Hosp.: *Nettion crecca, Anas platyrhynchos, Gallus domesticus.*
Distr. geogr.: Europa.
Evolução: Formas evolutivas em *Planorbis corneus*, segundo U. Szidat. 1935. que estabeleceu o ciclo biológico.

Notocotylus stagnicolae Herber, 1942.

Notocotylus stagnicolae Herber, 1942 pp. 184-190, pl. II, figs. 13-25.

Habitat: Cecos.
Hosp.: *Gallus domesticus, Anas platyrhynchos* (dom.),*Querquedula discors, Mergus merganser* (experimental), *Aegialitis semipalmata.*
Distr. geogr.: Estados Unidos.

Evolução: Estabelecida por Herber (1942); formas larvárias em *Stagnicola emarginata angulata*.

Notocotylus lucknowensis (Lal, 1935) n. comb.

Habitat: Cecos.
Hosp.: *Mareca penelope*.
Distr. geogr.: India.
Evolução: Desconhecida.
Observação: Harwood (1939), assinala esta espcie na sinonimia de *N. imbricatus*. Preferimos referi-la à parte no gênero *Notocotylus*, aceitando a sinonimia do gênero *Hindia*.

Ogmogaster Jägerskiöld, 1891

Ogmogaster Jägerskiöld, 1891 p. 131 *in ref.*
Ogmogaster, Price, 1932 p. 45.

Diagnose: NOTOCOTYLINAE: corpo ovalado, achatado no sentido dorso-ventral; Colar cefálico ausente; superficie ventral apresentando numerosas cristas longitudinais. Ventosa oral terminal. Faringe ausente. Cecos delgados extendendo-se até a extremidade posterior do corpo. Poro genital mediano ao nivel do esôfago. Bolsa do cirro mediana, dirigida no sentido vertical, com base na zona equatorial. Vesícula seminal externa presente. Testiculos lobados, simétricos, situados na porção posterior do corpo. Ovário lobádo, mediano, situado entre os testiculos. Glândula de Mehlis pre-ovariana. Canal de Laurer presente. Vitelinos consistindo de foliculos volumosos e isolados, distribuidos em dois campos logo acima da zona testicular. Útero muito circunvoluido ocupando quasi toda a porção mediana do corpo. Ovos com um longo filamento em cada polo. Poro excretor dorsal, mediano, subterminal. Vesicula excretora em forma de Y com os ramos laterais se unindo ao nivel da bifurcação intestinal, onde recebem um ramo coletor secundário, lateral.

Habitat: Intestino de Cetáceos e Pinipedes.
Espécie tipo: *Ogmogaster plicatus* (Creplin, 1827) Jägerskiöld, 1891.

Ogmogaster plicatus (Creplin, 1827) Jägerskiöld, 1891

(figs. 86, 87)

Monostoma plicatum Creplin, 1827 pp. 878-880, pl. 52, figs. 9-11, *in ref.*
Monostoma plicatum Dujardin, 1845 p. 344.

Ogmogaster plicatus Jägerskiöld, 1891, *in ref.*
Ogmogaster plicatus Kossack, 1911 p. 565.
Ogmogaster plicatus Price, 1932 pp. 45-46, pl. 12, fig. 52.

Habitat: Intestino.
Hosp.: *Balaenoptera acutorostrata*, (*Balaena rostrata*), *B. borealis*, *B. musculus*.
Distr. geogr.: Europa.
Evolução: Desconhecida.

Ogmogaster antarcticus Johnston, 1931

Ogmogaster plicatus Leiper et Atkinson, 1915 p. 15 *nec* Creplin, 1827 *nec* Jägerskiöld, 1891.
Ogmogaster antarcticus Johnston, 1931 pp. 97, 98.
Ogmogaster antarcticus, Johnston, 1937 pp. 18-22, figs. 26, 28.

Habitat: Intestino.
Hosp.: *Leptonychotes weddelli*, *Lobodon carcinophaga*.
Distr. geogr.: Noruega (Cabo Evans).
Evolução: Desconhecida.

Catatropis Odhner, 1905

Catatropis Odhner, 1905 p. 367, *in ref.*
Catatropis, Luehe, 1909 p. 32.
Notocotylus Diesing, 1839 *pro parte.*

Diagnose: NOTOCOTYLINAE; corpo alongado com a extremidade anterior delgada e a posterior largamente arredondada. Cutícula lisa ou provida de minúsculos espinhos; superfície ventrar do corpo provida de três fileiras de glândulas, sendo as duas laterais compostas de elementos separados e a mediana contínua, formando uma crista glandular. Faringe ausente. Esôfago delgado. Cecos longos, passando entre os testículos. Poro genital mediano, nas proximidades da bifurcação cecal. Bolsa do cirro desenvolvida, dirigida no sentido longitudinal, contendo cirro, ducto ejaculador e parte prostática envolta por numerosas células glandulares. Vesícula seminal externa, tubular, enovelada. Testículos geralmente lobádos, situados simétricamente na parte posterior do corpo. Ovário mediano, na zona testicular. Complexo da glândula da casca pre-ovariano. Espermatéca ausente. Vitelinos foliculares, distribuidos em dois grupos laterais, pretesticulares. Útero situado na área intracecal e mediana do corpo. Vagina

musculosa, tubular, paralela à bolsa do cirro. Ovos com um longo filamento em cada polo. Poro excretor mediano, posterior. Vesícula excretora curta bifurcando-se em forma de *Y*; os ramos se dirigem para a região cefálica margeando os campos cecais.

Habitat: Intestino de aves.
Espécie tipo: *Catatropis verrucosa* (Froelich, 1789) Odhner, 1905.

Catatropis verrucosa (Froelich, 1789) Odhner, 1905
(figs. 82, 83)

Fasciola verrucosa Froelich, 1789 p. 112, pl. IV, figs. 5-7, *in ref.*
Fasciola anseris Gmelin, 1789 p. 3055 *in ref.*
Festucaria pedata Schrank, 1796 p. 335, *in ref.*
Monostoma verrucosum Zeder, 1800 p. 155, *in ref.*
Monostoma verrucosum Rudolphi, 1809 p. 331 *et* 1919 pp .84, 344.
Monostomum ovatum Molin, 1895 *in ref.*
Notocotyle verrucosum Monticelli, 1892 *in ref.*
Catatropis verrucosa (Froelich) Odhner, 1905 pp. 367-370, fig. *in ref.*
Catatropis verrucosa, Luehe, 1909 p. 32, fig. 38.
Catatropis verrucosa Baylis, 1929 p. 38, fig. 22.
Catatropis verrucosa Monnig, 1934 p. 56, fig. 24.
Notocotylus triserialis Diesing, 1839, *pro parte.*

Habitat: Tracto intestinal.

Hosp.: Diversas aves (Anseriformes) domésticas e selvagens; o hospedeiro tipo citado por Froelich, seg. Diesing (1850) é "*Anser anser*" Gower (1939) cita os seguintes: *Anas platyrhynchos, Somateria mollissima, Mergus serrator. Bucephala clangula, Clangula hyemalis* e *Oidemia nigra.*

Distr. geogr.: Europa, Africa e Asia.

Evolução: Alguns autores referem o ciclo evolutivo desta espécie baseados no trabalho de Szidat (1930), sendo *Planorbis cornus* e *P. nitidus* referidos como hospedeiros intermediários. Segundo Szidat, em trabalho posterior, (1930) "... o ciclo evolutivo de *Catatropis verrucosa* não está ainda devidamente esclarecido", a espécie referida em 1930 não correspondendo a esta última.

Catatropis liara Kossack, 1911

Monostomum attenuatum Luehe, 1898 p. 625, *partim.*
Catatropis liara Kossack, 1911 p. 560 pl. 15, fig. 19.

Habitat: Cecos.
Hosp.: *Phoenicopterus roseus.*
Distr. geogr.: Tunisia.
Evolução: Desconhecida.

Catatropis charadrii Skrjabin, 1915

Catatropis charadrii Skrjabin, 1915 p. 270 *in ref.*
Catatropis charadrii Skrjabin, 1916 pp. 411-415.

Habitat: Intestino.
Hosp.: *Holodromus ochropus.*
Distr. geogr.: Montes Uraes-Russia.
Evolução: Desconhecida.

Catatropis gallinulae Johnston, 1928

Catatropis gallinulae Johnston, 1928 pp. 135-138, fig. 39.

Habitat: Ceco.
Hosp.: *Gallinula tenebrosa.*
Distr. geogr.: Australia.
Evolução: Desconhecida.
Observação: *Vide* observ. sobre *Notocotylus pacifera* (Noble, 1933).

Catatropis orientalis Harshe, 1932

Catatropis orientalis Harshe, 1932 pp. 33-38, figs. 5-9, *in ref.*

Habitat: Ceco.
Hosp.: *Dafila acuta.*
Distr. geogr.: India.
Evolução: Desconhecida.

Catatropis indicus Srivastava, 1935

Catatropis indicus Srivastava, 1935 pp. 283-287, 1 fig. *in ref.*

Habitat: Ceco.
Hosp.: *Gallus bankiva.*
Distr. geogr.: India.
Evolução: Desconhecida.

Catatropis pricei Harwood, 1939

Catatropis pricei Harwood, 1939 pp. 339-340, pl. 1, figs. 2, 3.

Habitat: Intestino.
Hosp.: *Branta canadensis.*
Distr. geogr.: Estados Unidos.
Evolução: Desconhecida.

Catatropis cygni Yamaguti, 1939

Catatropis cygni Yamaguti, 1939 p. 135, pl. XIII, fig. 4.

Habitat: Ceco.
Hosp.: *Cygnus bewickii jankowskii* e *Tadorna tadorna.*
Distr. geogr.: Japão.
Evolução: Desconhecida.

Catatropis hisikui Yamaguti, 1939

Catatropis hisikui Yamaguti, 1939 p. 136, pl. XIV, fig. 7.

Habitat: Intestino (?).
Hosp.: *Anser fabalis serrirostris.*
Distr. geogr.: Japão.
Evolução: Desconhecida.

Paramonostomum Luehe, 1909 emend.

Paramonostomum Luehe, 1909 p. 33.
Paramonostomum Luehe, 1909 emend. Yamaguti, 1934 p. 565.
Neoparamonostomum Lal, 1936 *in ref.*

Diagnose: NOTOCOTYLINAE, de corpo ovalado ou alongado. Colar cefálico ausente. Cutícula geralmente desprovida de espinhos, superfície ventral do corpo não apresentando formações glandulares. Faringe ausente. Esôfago curto. Cecos delgados e simples, passando entre os testículos em forma de)(. Poro genital mediano, no terço anterior do corpo. Bolsa do cirro bem desenvolvida, situada na metade anterior do corpo. Vesícula seminal externa. Testículos situados simètricamente na porção caudal, com campos afastados. Ovário mediano situado na zona testicular. Complexo da glândula da casca pretesticular. Espermatéca ausente. Vitelinos compostos de ácines volumosos disseminados para

a frente da zona testicular, nas margens laterais do corpo. Útero ocupando a região mediana do corpo, acima da zona ovariana. Vagina paralela à bolsa do cirro. Ovos numerosos com filamentos polares.

Habitat: Tubo digestivo de aves aquáticas.

Espécie tipo: *Paramonostomum alveatum* (Mehlis, *in* Creplin, 1846) Luehe, 1909.

Observação: Lal (1936), propôs o gênero *Neoparamonostomum* designando *Paramonostomum ionorne* Travassos, 1921 como tipo. O gênero de Lal se baseia nos seguintes caracteres: situação do póro genital (post-bifurcal) e extensão dos vitelinos que atingem e ultrapassam a zona equatorial para a frente. Harwood (1939 p. 335), fez ver, com razão, que esse gênero não deve ser mantido, passando para a sinonímia de *Paramonostomum*.

Paramonostomum alveatum (Mehlis, in Creplin, 1946) Luehe, 1909 (fig. 81.)

Monostomum alveatum Mehlis, *in* Creplin, 1846 pp. 141-144.
Monostomum alveatum (Mehlis, 1945), Neveu-Lemaire, 1936 p. 103.
Notocotyle alveatum Monticelli, 1892 *in ref.*
Monostomum alveatum Muehling, 1898 pp. 31, 101, 102, pl. I, fig. 3.
Monostomum alveiforme Cohn, 1904 p. 230.
Paramonostomum alveatum (Mehlis ?, Creplin) Luehe, 1909 p. 33, fig. 39.

Habitat: Tracto intestinal.

Hosp.: *Anas platyrhynchos, Clangula hyemalis, Somateria mollissima, Oidemia nigra, Oidemia fusca, Nyroca marila, Mareca penelope, Anser anser, Cygnus cygnus, Cygnus olor, Brante bernicla.* Lista baseada nas citações de Creplin (1846), Muehling (1898), Luehe (1909) e Gower (1939).

Distr. geogr.: Europa.

Evolução: Desconhecida.

Paramonostomum ionorne Travassos, 1921

Paramonostomum ionorne Travassos, 1921 p. 179, fig.
Neoparamonostomum ionorne (Trav.) Lal, 1936 *in ref.*

Habitat: Intestino e ceco.

Hosp.: *Ionornis martinica, Parra jacana, Rimnopardalis rythirhynchus,* (Trav.). *Chionis alba,* (Bayliss).

Distr. geogr.: Rio de Janeiro, Brasil e Patagônia.

Evolução: Desconhecida.

Paramonostomum echinum Harrah, 1922

Paramonostomum echinum Harrah, 1922 p. 55.
Neoparamonostomum echinum (Harrah) Lal, 1936 *in ref.*

Habitat: Intestino.
Hosp.: *Ondrata zibethica.*
Distr. geogr.: Estados Unidos.
Evolução: Desconhecida.

Paramonostomum pseudoalveatum Price, 1931

Paramonostomum pseudoalveatum Price, 1931 pp. 9-10, fig. 4.

Habitat: Ceco.
Hosp.: *Ondrata zibethica* e *Branta canadensis.*
Distr. geogr.: Estados Unidos e Canadá.
Evolução: Desconhecida.
Observação: Segundo Harwood (1939), é possivel que a espécie assinalada por Swales (1933) em *Branta canadensis*, corresponda a *P. parvum.*

Paramonostomum parvum Stunkard & Dunihue, 1931

Paramonostomum parvum Stunkard & Dunihue, 1931 pp. 184-185, fig. 4.
Neoparamonostomum parvum (Stunkard & Dunihue) Lal, 1936 *in ref.*

Habitat: Intestino.
Hosp.: "Long Island duck" (tipo ref.), *Chen caerulescens, Glaucionetta clangula americana.*
Distr. geogr.: Estados Unidos, Canadá.
Evolução: Desconhecida.

Paramonostomum microstomum Moghe, 1932

Paramonostomum microstomum Moghe, 1932 pp. 56-58, fig. 4

Habitat: Reto.
Hosp.: *Philomachus pugnax.*
Distr. geogr.: India.
Evolução: Desconhecida.

Paramonostomum elongatum Yamaguti, 1934

Paramonostomum elongatum Yamaguti, 1934 pp. 561-564. fig. 8.

Habitat: Ceco.
Hosp.: *Olor bewicki jankowiskii, Olor cygnus.*
Distr. geogr.: Coréa, Japão.
Evolução: Desconhecida.

Paramonostomum ovatum Hsü, 1935

Paramonostomum ovatum Hsü, 1935 pp. 147-148, fig. 9.
Paramonostomum "ovatus", Harwood, 1939 p. 337.

Habitat: Ceco.
Hosp.: "Pato" (sp.).
Distr. geogr.: China.
Evolução: Desconhecida.

Paramonostomum bucephalae Yamaguti, 1935

Paramonostomum bucephalae Yamaguti, 1935 pp. 163-165, fig. 4.
Paramonostomum bucephalae, Yamaguti, 1939 p. 138.

Habitat: Ceco.
Hosp.: *Bucephala clangula, Tadorna tadorna, Spatula clypeata, Nyroca marila mariloides.*
Distr. geogr.: Japão.
Evolução: Desconhecida.

Paramonostomum querquedulum Lal, 1936

Paramonostomum casarcum Lal, 1936 pp. 27-29, figs. 3, 4. *in ref.*

Habitat: Ceco.
Hosp.: *Querquedula circia.*
Distr. geogr.: India.
Evolução: Desconhecida.

Paramonostomum carsacum Lal, 1936.

Paramonostomum carsacum Lal, 1936 pp. 27-29, figs 3, 4 *in ref.*

Habitat: Ceco.
Hosp.: *Casarca rutila.*
Distr. geogr.: India.
Evolução: Desconhecida.

Ogmocotyle Skrjabin & Schulz, 1933 emend.

Ogmocotyle Skrjabin & Schulz, 1933 pp. 269-270
Cymbiforma Yamaguti, 1933 p. 102.
"*Cimbiforma*" Ruiz, 1944 pp. 217, 118, 225.

Diagnose: NOTOCOTYLINAE; corpo alongado com as margens laterais fortemente recurvadas para a face ventral, dando a idéia de uma naveta. Cutícula inerme. Glândulas ventrais ausentes. Faringe ausente. Esôfago simples e delgado. Cecos longos. Poro genital fora de linha mediana, quasi marginal, situado acima da região equatorial. Bolsa do cirro muito desenvolvida, em forma de *C*, contendo cirro, ducto ejaculador, parte prostática e vesícula seminal. Testículos alongados, mais ou menos lobados, situados na porção posterior do corpo. Ovário de contorno liso ou lobado, mediano, postesticular. Complexo da glândula da casca pré-ovariano. Espermatéca ausente. Vitelinos foliculares, dorsais aos testículos e convergindo na zona destes em forma de *U* ou *V*. Útero com alças largas, intra e extracecais, extendendo-se desde a zona ovariana até a região equatorial. Ovos com um filamento em cada polo. Poro excretor mediano, posterior. Vesícula excretora curta; dois longos troncos coletores mergeiam os campos cecais e se unem na região anterior do corpo formando numerosas anastomoses.

Habitat: Tubo digestivo de mamíferos.

Espécie tipo: *Ogmocotyle pygargi* Skrjabin & Schulz, 1933.

Observação: Skrkabin & Schulz (1933), descreveram o gênero *Ogmocotyle* para uma nova espécie do intestino delgado de *Capreolus pygargus bedfordi*, (Siberia, Russia), estaeblecendo uma nova subfamília, OGMOCOTYLINAE, entre os NOTOCOTYLIDAE.

No mesmo ano Yamaguti descreve o gênero *Cymbiforma* para uma nova espécie do intestino delgado de *Sika nippon nippon*, (Japão), eregendo a subfamília *Cymbiforminae*.

Em 1939, Harwood identifica esta última subfamília a OGMOCOTYLINAE.

Em 1944 consideramos OGMOCOTYLINAE sinônima de NOTOCOTYLINAE.

A diagnose original do gênero *Ogmocotyle* e a diagnose do gênero *Cymbiforma* dada por Yamaguti ou a emendada por Bhalerao (1942), não mostram um caracter de importância fundamental que permita considerar distintos os referidos gêneros, apenas se completando. É nosso parecer considerá-los idênticos. O trabalho de Skrjabin & Schulz, no volume 102, fac. 1, 2 do Zool. Anz., foi dado à publicidade em março de 1933 e o de Yamaguti, no vol. 5, fac. 1 de Jap. Journ. Zool., publicado em agosto de 1933, é pois evidente a prioridade de *Ogmocotyle* sobre *Cymbiforma*.

Ogmocotyle pygargi Skrjabin & Schulz, 1933

Ogmocotyle pygargi Skrjabin & Schulz, 1933 pp. 267-270, 2 figs.

Habitat: Intestino delgado.
Hosp.: *Capreolus pygargus bedfordi.*
Distr. geogr.: Russia. Sibéria.
Evolução: Desconhecida.

Ogmacotyle sikae (Yamaguti, 1933) n. comb.

Cymbiforma sikae Yamaguti, 1933 pp. 98, 101, 102, fig. 41.

Habitat: Intestino delgado.
Hosp.: *Sika nippon nippon.*
Distr. geogr.: Japão.
Evolução: Desconhecida.

Ogmocotyle indica (Bhalerao, 1942) n. comb.

Cymbiforma indica Bhalerao, 1942, pp. 133-136, figs. 1-6.

Habitat: Intestino e ductos biliares.
Hosp.: Vários ruminantes, (cabra, carneiro, boi).
Distr. geogr.: India.
Evolução: Desconhecida.

Quinqueserialis Skvortsow, 1935 emend.

Quinqueserialis Skvortsow, 1935 p. 319 in *ref.*
Quinqueserialis Skv., 1935 in Harwood, 1939 p. 430.
Barkeria Szidat, 1936 p. 234.
Notocotylus Diesing, 1839 *pro parte.*

Diagnose: NOTOCOTYLINAE; corpo alongado de tamanho médio, com extremidades arredondadas sendo a anterior mais atenuada. Colar cefálico ausente. Cutícula podendo apresentar pequenos espinhos. Superfície ventrar provida de numerosas glândulas isoladas e dispostas em cinco fileiras longitudinais. Faringe ausente. Cecos simples, terminando no extremo posterior e passando entre os testículos. Poro genital mediano, situado nas imediações da bifurcação cecal. Bolsa do cirro bem desenvolvida, situada na metade anterior e na linha mediana do corpo, dirigida no sentido longitudinal. Vesícula seminal externa na sua maior porção. Testículos situados simètricamente na porção caudal, em campos

afastados. Ovário mediano, disposto entre os testículos, separado destes pelos campos cecais. Complexo da glândula da casca préovariano. Espermatéca ausente. Vitelinos foliculares, dispostos para a frente dos testículos, extracecais. Útero situado na região mediana do corpo, preovariano. Vagina paralela à bolsa do cirro. Ovos numerosos apresentando um longo filamento em cada polo. Poro excretor subterminal; vesícula excretora curta; canais coletores primários, emergindo da vesícula em forma de V, margeando os campos laterais, se unem na extremidade anterior do corpo.

Habitat: Tracto intestinal de mamíferos (roedores).

Espécie-tipo: *Quinqueserialis quinqueserialis* (Barker & Laughlin, 1911).

Skvortsow, em 1935 estabeleceu o sub-gênero *Quinqueserialis* para espécies do gênero *Notocotylus* possuindo cinco fileiras de glândulas ventrais.

Harwood, em 1939 apresenta a denominação *Quinqueserialis* com o valor de gênero atribuindo-a a Skvortsow.

U. Szidat, em 1936, baseando-se no mesmo caracter, isto é, na presença de cinco fileiras de glândulas na superfície ventrar, crea o gênero *Barkeria* no qual inclui *B. quinqueserialis* (= *Notocotylus Quinqueserialis*, Barker & Laughlin, 1911) e *B. hassalli* (= *Notocotylus hassalli* McIntosh & McIntosh, 1934). O gênero *Barkeria* foi posto na sinonimia de *Quinqueserialis* por Harwood em 1939.

Quinqueserialis quinqueserialis (Barker & Laughlin, 1911)

(fig. 84)

Notocotyle quinqueserialis Barker & Laughlin, 1911 pp. 261-274, pl. I *in ref*
Notocotylus urbanensis Harrah, 1922 *pro parte*.
Quinqueserialis quinqueserialis (Barker, 1915) Skvortsow, 1935 *in ref*.
Quinqueserialis quinqueserialis (B. *et* L. 1911) Harwood, 1939 p. 430.
Barkeria quinqueserialis (B. *et* L., 1911) Szidat, 1936 p. 234.

Habitat: Ceco.

Hosp.: *Ondrata zibethica*, *Microtus pennsylvanicus pennsylvanicus*, *Zapus hudsonius*.

Distr. geogr.: Estados Unidos, Canadá.

Evolução: O ciclo evolutivo desta espécie foi estabelecido em 1942 por Herber que assinala *Gyraulus parvus* (Say) como hospedeiro intermediário.

Quinqueserialis hassalli (McIntosh & McIntosh, 1934)

Monostomum sp. Stiles e Hassall, 1894 (*ad Arvicola riparius*).
Notocotylus Hassalli McIntosh & McIntosh, 1934 pp. 30-37, figs. 11-12.

Notocotylus quinqueserialis Harrah, 1922 p. 53, *nec* B. *et* Laughlin, 1911.
Quinqueserialis hassalli (McIntosh & McIntosh) Harwood, 1939 p. 431.
Barkeria Hassalli (McIntosh & McIntosh) Szidat, 1936 p. 234.

Habitat: Intestino delgado e ceco.
Hosp.: *Microtus pennsylvanicus pennsylvaricus, Zapus hudsonius hudsonius.*
Distr. geogr.: Estados Unidos.
Evolução: Desconhecida.

Quinqueserialis wolgaensis Skvortsov, 1935

Notocotylus (Quinqueserialis) wolgaensis Skvortsov, 1935 p. 319, *in ref.*
Quinqueserialis wolgaensis Skvortsov, 1935, in Harwood, 1939 p. 430.
Notocotylus wolgaensis Herber, 1942 p. 184.

Habitat: Intestino.
Hosp.: *Arvicola terrestris.*
Distr. geogr.: Russia.
Evolução: Desconhecida.

Hofmonostomum Harwood, 1939

Hofmonostomum Harwood, 1939 p. 338.

Diagnose: NOTOCOTYLINAE; corpo alongado e pequeno com a metade anterior mais atenuada; superficie ventrar apresentando uma crista glandular, pouco desenvolvida, na parte mediana; glândulas ventrais laterais ausentes. Cuticula lisa na porção posterior e com pequenas escamas espiniformes na superficie ventrar da parte anterior. Ventosa oral subterminal. Esôfago delgado. Faringe ausente. Cecos longos, terminando entre os testiculos e na zona destes. Poro genital post-bifurcal e mediano. Testículos alongados, lobados, simétricos, situados na porção posterior do corpo. Bolsa do cirro bem desenvolvida, situada na metade anterior do corpo; vesicula seminal externa, enovelada. Ovário lobado, mediano, situado entre os testículos; complexo da glândula da casca pre-ovariano. Vitelinos distribuidos em dois campos distintos, ao longo das margens laterais, atingindo posteriormente o limite inferior da zona testicular. Útero intra-cecal, pre-ovariano. Vagina longa e paralela à bolsa do cirro. Ovos com um longo filamento em cada polo. Sistema excretor?

Habitat: Tracto intestinal de aves.
Espécie tipo: *Hofmonostomum himantopodis* Harwood, 1939.

Hofmonostomum himantopodis Harwood, 1939

(fig. 85)

Hofmonostomum himantopodis Harwood, 1939 p. 338, pl. I, fig. 1.

Habitat: Intestino.
Hosp.: *Himantopus mexicanus.*
Distr. geogr.: Porto Rico.
Evolução: Desconhecida.

Sub-familia NUDACOTYLINAE Barker, 1916

NUDACOTYLINAE Barker, 1916 pp. 181-183.
NUDOCOTYLINAE "Barker, 1919", Harrah, 1922 p. 56 (erro).
NUDACOTYLIDAE Barker, 1916, Travassos, 1922 p. 187, (erro).
NUDACOTYLINAE Barker, 1916 emend. Ruiz, 1944 p. 225.

Diagnose: PRONOCEPHALIDAE; corpo pequeno; superfície ventral desprovida de formações glandulares. Colar cefálico ausente; extremidade posterior arredondada, lisa. Poro genital lateral, situado na metade posterior do corpo, imediatamente acima da zona testicular. Testículos em número de dois, situados no terço posterior do corpo. Bolsa do cirro desenvolvida; vesícula seminal interna e externa. Ovário pre ou postesticular. Complexo da glândula da casca pre ou postovariano. Útero nas áreas intra e extracecais, acima dos demais orgãos genitais. Vitelinos constituidos por dois grupos de folículos que se extendem nas margens do corpo, acima da zona testicular. Ovos com filamentos polares. Parasitos de mamíferos paludicolas.

Gênero tipo: *Nudacotyle* Barker, 1916.

Esta sub-familia contem apenas dois gêneros que podem ser diferenciados da seguinte forma:

Ovário postesticular; complexo da glândula da casca pre-ovariano .... *Nudacotyle* Barker, 1916.
Ovário pretesticular; complexo da glândula da casca postovariano .... *Neocotyle* Travassos, 1922.

Nudacotyle Barker, 1916

Nudacotyle Barker, 1916 p. 181.
Nudacotyle Travassos, 1939 p. 161.

Diagnose: NUDACOTYLINAE. Trematoides pequenos, de corpo em forma de concha. Faringe ausente. Cecos delgados e longos, simples, extendendo-se até próximo da extremidade posterior do corpo. Poros genitais separados, situados na metade posterior do corpo, imediatamente acima da zona testicular. Bolsa do cirro muito desenvolvida contendo cirro musculoso e uma parte prostática volumosa. Vesícula seminal externa e interna (?). Testículos posteriores, com zonas coincidentes e campos afastados. Ovário lobado, postesticular. Útero formando numerosas circunvoluções, intra e extracecais, na parte média do corpo, acima dos demais orgãos genitais. Ovos com um longo filamento em cada polo. Vitelinos laterais, postequatoriais.

Habitat: Intestino delgada de mamíferos.

Espécie tipo: *Nudacotyle novicia* Barker, 1916.

Observação: A presente diagnose, com modificações muito ligeiras, foi dada por Travassos em 1939.

Nudacotyle novicia Barker, 1916

(fig. 62)

Nudacotyle novicia Barker, 1916 pp. 175-183, pl. 25, figs. 1-4.
Nodocotyle novicia Harrah, 1922 p. 56.
Cercaria marilli Barker, 1939, pp. 653-656; figs. 4-5.

Habitat: Intestino e ductos biliares.

Hosp.: *Ondrata zibethica, Microtus pennsylvanicus pennsylvanicus.*

Distr. geogr.: Estados Unidos.

Evolução: Determinada por Ameel, experimentalmente (1944). Hospedeiro intermediário *Pomatiopsis lapidaria* Say.

Nudacotyle valdevaginatus Travassos, 1922

Nudacotyle valdevaginatus Travassos, 1922 p. 187.
Nudacotyle valdevaginatus Travassos, 1939 p. 163, figs. 1-3.
Nudacotyle valdevaginata Trav. *et* col., 1939 p. 226.

Habitat: Intestino delgado.

Hosp.: *Hydrochoerus capybara.*

Distr. geogr.: Mato Grosso, Brasil.

Evolução: Desconhecida.

Nudacotyle tertius Travassos, 1939

Nudacotyle tertius Travassos, 1939 pp. 163-165, figs. 4-7.

Habitat: Intestino delgado.
Hosp.: *Hydrochoerus capybara.*
Distr. geogr.: Est. do Rio. Brasil.
Evolução: Desconhecida.

Neocotyle Travassos, 1922

Neocotyle Travassos, 1922 p. 187.
Neocotyle Travassos, 1939 p. 165.

Diagnose: NUDACOTYLINAE. Trematoides pequenos, de corpo em forma de concha. Tegumento aparentemente liso. Ventosa oral pequena e forte. Faringe ausente. Cecos delgados e se extendendo até perto da extremidade posterior do corpo. Poros genitais contíguos, na metade posterior do corpo, laterais. Bolsa do cirro e vagina muito desenvolvidas. Vesicula seminal interna e externa. Testiculos posteriores. Ovário pretesticular. Útero com ramo ascendente e descendente, com numerosos ovos de filamento polar. Vitelinos laterais, extracecais, postequatoriais.

Habitat: Intestino delgado de mamíferos.
Espécie tipo: *Neocotyle neocotyle* Travassos, 1922.
Observação: A presente diagnose foi dada por Travassos em 1939.

Neocotyle neocotyle Travassos, 1922
(fig. 65)

Neocotyle neocotyle Travassos, 1922 p. 187.
Neocotyle neocotyle Travassos, 1939 pp. 165-167, figs. 8-16.

Habitat: Intestino delgado.
Hosp.: *Hydrochoerus capybara.*
Distr. geogr.: Mato Grosso, Brasil.
Evolução: Desconhecida.

Sub-família CHARAXICEPHALINAE Price, 1931

CHARAXICEPHALINAE Price, 1931 p. 9.
CHARAXICEPHALINAE Mehra, 1932 p. 246.
CHARAXICEPHALINAE Ruiz, 1944 p. 226.

Diagnose: PRONOCEPHALIDAE; corpo de tamanho médio, alongado; colar céfalico presente ou ausente; extremidade posterior truncada e apresentando formações papilosas contráteis. Bolsa do cirro contendo cirro, ducto ejaculador e parte prostática; vesícula seminal externa. Poro genital situado à esquerda da linha mediana, na metade anterior do corpo. Testiculos divididos num número variável de folículos individualizados, dispostos em fileiras ao longo dos campos cecais. Ovário situado na zona postesticular ou testicular. Complexo da glândula da casca atrás do ovário. Útero situado principalmente na área intracecal, na parte mediana do corpo. Vitelinos constituidos por dois grupos de folículos disseminados nos campos laterais do corpo, nas zonas testicular, pré ou postesticular. Ovos com filamentos polares.

Habitat: Tracto intestinal de quelônios.

Gênero tipo: *Charaxicephalus* Looss, 1901.

Aceitamos com Mehra, a inclusão, nesta subfamília, de três gêneros que podem ser separados da seguinte forma:

1 — Vitelinos prétesticulares na sua maior parte; testículos situados no terço posterior do corpo; ovário na zona testicular ou pretesticular .... *Diaschistorchis* Johnston, 1913.

Vitelinos postesticulares em grande parte; testiculos situados no terço médio do corpo; ovário postesticular 2

2 — Testículos extracecais; vitelinos intratesticulares .... *Desmogonius* Stephens, 1911.

Testículos intracecais; vitelinos extratesticulares .... *Charaxicephalus* Looss. 1901.

Charaxicephalus Looss, 1901

Charaxicephalus Looss, 1901 p. 621.
Charaxicephalus Looss, 1902 pp. 612-613.

Diagnose: CHARAXICEPHALINAE; corpo de tamanho médio, muito robusto; extremidade posterior apresentando duas saliências papilosas marginais e simétricas. Colar cefálico com margens bem nitidas formando uma depressão angulosa na região medio-ventral. Cecos longos, atingindo o extremo posterior do corpo, laterais e paralelos, apresentando ramificações amplas em ambos os lados e em toda a sua extensão. Poro genital situado à esquerda da linha mediana, no

terço anterior do corpo. Bolsa do cirro relativamente pequena, situada obliquamente; vesicula seminal enovelada, externa. Testiculos divididos em numerosos foliculos individualizados e dispostos em duas fileiras longitudinais, paralelas, intracecais, na porção mediana do corpo. Ovário globóide, situado atrás dos testiculos. Complexo da glândula da casca postovariano. Vitelinos distribuidos em dois grupos laterais, pre-ovarianos. Útero pre-ovariano e na região intracecal. Ovos com um tufo de finos filamentos em ambos os polos. Poro excretor posterior, mediano; ramos da vesícula excretora dirigidos para a extremidade frontal onde terminam em fundo cégo; apresentam ramificações parcialmente anastomosadas.

Habitat: Estomago e intestino de quelônios marinhos.
Espécie tipo: *Charaxicephalus robustus* Looss, 1901.

Charaxicephalus robustus Looss, 1901

(fig. 68)

Charaxicephalus robustus Looss, 1901 p. 621.
Charaxicephalus robustus Looss, 1902 p. 541, pl. 25, figs. 65-69, pl. 26, fig. 89.

Habitat: Estômago.
Hosp.: *Chelone mydas.*
Distr. geogr.: Egipto.
Evolução: Desconhecida.

Charaxicephalus loossi Mehra, 1939

Charaxicephalus loossi Mehra, 1939 pp. 104-109, figs. 3-5.

Habitat: Intestino delgado.
Hosp.: *Chelone mydas.*
Distr. geogr.: India.
Evolução: Desconhecida.

Desmogonius Stephens, 1911

Desmogonius Stephens, 1911 pp. 497-499.

Diagnose: CHARAXICEPHALINAE; corpo de tamanho médio, concavo-convexo; extremidade anterior delgada e a posterior mais arredondada e apresentando duas protuberâncias cônicas, simétricas. Colar cefálico ausente. Cuticula inerme. Cecos amplos, atingindo a extremidade posterior e apresentando diverticulos

internos e externos em toda a extensão. Poro genital (átrio) desviado para a esquerda da linha mediana e situado no limite inferior do terço anterior do corpo. Bolsa do cirro bem desenvolvida, inclinada. Vesícula seminal externa. Testículos divididos em numerosos folículos globóides, dispostos em fileiras longitudinais e marginais, no terço médio do corpo. Ovário submediano, situado nas proximidades do extremo posterior. Vitelinos formados por dois grupos de folículos disseminados nos lados do corpo, entre as zonas ovariana e testicular. Ramos uterinos ocupando a porção mediana do corpo, entre o ovário e o poro genital, intratesticulares. Ovos operculados, com um tufo de filamentos em ambos os polos.

Habitat: Tracto intestinal de quelônio.
Espécie tipo: *Desmogonius desmogonius* Stephens, 1911.

Desmogonius desmogonius Stephens, 1911

(fig. 77)

Desmogonius desmogonius Stephens, 1911 pp. 497-499, pl. XIII, 1 fig.

Habitat: Tubo digestivo.
Hosp.: *Chelone mydas*.
Distr. geogr.: Nicaragua.
Evolução: Desconhecida.

Diaschistorchis Johnston, 1913

Diaschistorchis Johnston, 1913 p. 378.
Wilderia Pratt, 1914 p. 412.
Synechorchis Barker, 1922 p. 223, *in ref.*
Diaschistorchis Johnston, 1913 emend. Mehra, 1932 p. 225.

Diagnose: CHARAXICEPHALINAE; corpo de tamanho médio, espesso e musculoso, em forma de navêta. Colar cefálico pouco desenvolvido ou ausente. Faringe ausente. Esôfago curto e delgado. Cecos longos, se extendendo até a extremidade posterior e apresentando divertículos laterais. Poro genital situado à esquerda da linha mediana, sobre a face ventral, do ramo cecal esquerdo, no terço anterior do corpo. Bolsa do cirro bem desenvolvida, situada oblíqua ou transversalmente ao nivel do quarto anterior do corpo; vesícula seminal externa, tubular, enovelada. Testiculos divididos em numerosos folículos separados e dispostos em forma de *U* na extremidade posterior do corpo. Ovário liso ou lobado, situado ao nivel do limite superior da zona testicular, ou um pouco abaixo desse nivel. Complexo da glândula da casca na linha mediana

do corpo num nivel imediatamente inferior ao do ovário. Espermatéca ausente. Canal de Laurer presente. Vitelinos, compostos de numerosos foliculos, dispostos em dois grupos laterais e situados ventralmente em relação aos cecos, disseminados para cima da zona ovariana e terminando em alturas variáveis. Útero apresentando numerosas circunvoluções que preenchem inteiramente o espaço intercecal compreendido entre a base da bolsa do cirro e o ovário. Vagina musculosa e bem desenvolvida. Ovos com filamentos polares.

Habitat: Tracto intestinal de quelônios.
Espécie tipo: *Diaschistorchis pandus* (Braun, 1901) Johnston, 1913.

Diaschistorchis pandus (Braun, 1901) Johnston, 1913

(figs. 74-76)

Monostomum pandum Braun, 1901 pp. 48-50, pl. II, fig. 17.
Diaschistorchis pandus (Br. 1901) Johnston, 1913 p. 378, figs. 9-10.
Wilderia elliptica Pratt, 1914 p. 411, fig.
Diaschistorchis ellipticus (Pratt, 1914) Price, 1931 p. 6.
Synechorchis megas Barker, 1922 p. 223, figs. 13-22., *in ref.*
Diaschistorchis pandus (Br. 1901) Oguro, 1936 pp. 21-23, fig. 17.

Habitat: Estomago.
Hosp.: *Caretta caretta, Eretmochelys imbricata, Chelone mydas.*
Distr. geogr.: Golfo do Mexico, Ilhas Bermudas, Australia, Cuba, Japão.
Evolução: Desconhecida.

Diaschistorchis gastricus Mehra, 1932

Diaschistorchis gastricus Mehra, 1932 pp. 226-236, figs. 1-4.

Habitat: Estómago.
Hosp.: *Kachuga dhongoka, K. smithii, K. tectum, Hardella thurgi.*
Distr. geogr.: India.
Evolução: Desconhecida.

Diaschistorchis lateralis Oguro, 1936

Diaschistorchis lateralis Oguro, 1936 pp. 23-26, fig. 18.

Habitat: (?)
Hosp.: *Chelonia japonica.*
Distr. geogr.: Japão.
Evolução: Desconhecida

Diaschistorchis takahashii Fukui & Ozaka, 1936

Diaschistorchis takahashii Fukui & Ozaka, 1936 pp. 1707-1710, *in ref.*

Habitat:
Hosp.: *Ocadia sinensis.*
Distr. geogr.: Japão.
Evolução: Desconhecida.

Subfamília NEOPRONOCEPHALINAE Mehra, 1932

NEOPRONOCEPHALINAE Mehra, 1932 p. 245, pp.
NEOPRONOCEPHALINAE Ruiz, 1944 p. 226.

Diagnose: PRONOCEPHALIDAE; corpo pequeno; colar cefálico presente; extremidade posterior truncada. Poro genital na metade anterior do corpo, à esquerda da linha mediana. Testículos, em número de dois, situados simètricamente diante do ovário, no terço médio do corpo. Ovário localizado no terço posterior do corpo, submediano. Complexo da glândula da casca imediatamente atrás do ovário. Útero apresentando numerosas circunvoluções dirigidas em todos os sentidos e ocupando a parte mediana do corpo. Vitelinos formados por dois grupos de folículos laterais e postesticulares. Ovos operculados (filamentos?).

Habitat: Tracto intestinal de quelônios.
Gênero tipo: *Neopronocephalus* Mehra, 1932.

Neopronocephalus Mehra, 1932 emend.

Neopronocephalus Mehra, 1932 p. 236.

Diagnose: NEOPRONOCEPHALINAE; corpo pequeno e alongado; extremidade anterior atenuada e a posterior truncada. Colar cefálico bem desenvolvido, contínuo, com exceção da parte ventral. Faringe ausente. Esôfago longo. Ramos cecais simples, passando entre os testículos ou sobre os campos dos mesmos, terminando ao nivel do terço posterior do corpo. Átrio genital ausente. Poros genitais contíguos, à esquerda da linha mediana, no terço anterior do corpo. Bolsa do cirro oval ou claviforme, pretesticular, contendo uma porção prostática muito desenvolvida. Vesícula seminal externa, tubular. Testículos lisos situados no terço médio do corpo, em campos bem afastados e zonas coincidentes. Ovário liso, submediano, postesticular; complexo da glândula da casca imediatamente atrás do ovário. Espermatéca ausente. Canal de Laurer presente. Vitelinos

compostos de dois grupos de folículos volumosos e pouco numerosos, situados entre as zonas testicular e ovariana. Útero pre e postovariano, apresentando numerosas circunvoluções caracteristicas. Vagina musculosa, à esquerda da bolsa do cirro, circundada por células glandulares. Ovos elipsóides, operculados (filamentos?). Poro excretor dorsal ou ventrar, subterminal. Vesícula excretora em forma de V cujos ramos não atingem o nivel da zona ovariana.

Habitat: Tracto intestinal de quelônios d'água doce.
Espécie tipo: *Neopronocephalus triangularis* Mehra, 1932.

Neopronocephalus triangularis Mehra, 1932

(fig. 78)

Neopronocephalus triangularis Mehra, 1932 pp. 236-240, fig. 5.

Habitat: Intestino.
Hosp.: *Kachuga dhongoka*.
Distr. geogr.: India.
Evolução: Desconhecida.

Neopronocephalus gangeticus Mehra, 1932

Neopronocephalus gangeticus Mehra, 1932 pp. 240-244, fig. 6.

Habitat: Intestino.
Hosp.: *Kachuga dhongoka*.
Distr. geogr.: India.
Evolução: Desconhecida.

Neopronocephalus mehrai Chatterji, 1936

Neopronocephalus mehrai Chatterji, 1936 pp. 86-88, fig. 4.

Habitat: Intestino (?).
Hosp.: *Morenia ocellata*.
Distr. geogr.: *Burma*, India.
Evolução: Desconhecida.

Subfamília OPISTHOTREMATINAE Harwood, 1939

OPISTHOTREMATIDAE Poche, 1925 p. 213.
OPISTHOTREMATINAE Harwood, 1939 p. 334.
OPISTHOTREMATINAE Ruiz, 1944 p. 226.

Diagnose: PRONOCEPHALIDAE: corpo achatado de forma arredondada ou ovalada; superfície ventral espinhosa; colar cefálico ausente. Poro genital mediano, situado na extremidade posterior do corpo. Testículos, em número de dois, intra ou extracecais, simétricos, na metade posterior do corpo. Bolsa do cirro delgada; vesícula seminal externa ausente. Ovário, ao lado da linha mediana, pretesticular. Complexo da glândula da casca imediatamente atrás do ovário. Útero na parte média do corpo, principalmente na área intracecal. Vitelinos pouco desenvolvidos, na área intracecal e pretesticular. Ovos com filamentos polares.

Habitat: Cavidade nasal, esôfago e pulmão de mamíferos aquáticos.

Gênero tipo: *Opisthotrema* Fischer, 1883.

Consideramos nesta subfamília três gêneros que podem ser diferenciados pela seguinte chave:

1 — Orla muscular limitando as faces dorsal e ventral ausente .... *Opisthotrema* Fischer, 1883.
Orla muscular limitando as faces dorsal e ventral presente 2

2 — Testículos intracecais .... *Pulmonicola* Poche, 1925.
Testículos extracecais .... *Cochicotrema* Trav. & Vogelsang, 1931.

Opisthotrema Fischer, 1883

Opisthotrema Fischer, 1883 pp. 1-42, *in ref.*
Opisthotrema Price, 1932 p. 48 (em parte).

Diagnose: OPISTHOTREMATINAE; corpo piriforme, achatado, com as margens recurvadas para a face ventral. Ventosa oral subterminal, ventral. Faringe ausente. Esôfago delgado. Cecos relativamente largos e ligeiramente sinuosos, atingindo as proximidades do extremo posterior. Poro genital mediano, situado na parte posterior do corpo. Testículos lobados, simétricos, extracecais, na metade posterior do corpo. Bolsa do cirro posterior, mediana, contendo a vesicula seminal. Ovário lobado, pretesticular, ao lado da linha mediana. Complexo da glândula da casca postovariano. Canal de Laurer presente, com a parte proximal dilatada formando um *receptaculum seminis* (espermatéca). Vitelinos distribuidos em dois campos distintos acima dos testículos, mormente intracecais. Útero intracecal, no terço médio do corpo. Vagina delgada paralela à bolsa do cirro. Ovos providos de um longo filamento em cada polo. Sistema excretor mal definido.

Habitat: Cavidades nasais e esôfago de *Sirenia*.
Espécie tipo: *Opisthotrema dujonis* (Leuckart, 1874) Price, 1932.

Observação: A presente diagnose genérica à baseada na descrição da espécie tipo apresentada por Price, em 1932 e Johnston, em 1913. Não aceitamos a diagnose apresentada por Price (1932, p. 49) para o gênero *Opisthotrema* porquanto o autor considera o gênero *Cochleotrema* Trav. & Vogel, sinônimo de *Opisthotrema* Fischer, incluindo na mesma os caracteres de ambos. — A nosso ver o gênero *Cochleotrema* é perfeitamente distinto de *Opisthotrema* e de *Pulmonicola*, embora apresente caracteres comuns a ambos; assim, a presença de uma orla muscular limitando as faces dorsal e ventral é um caráter de *Pulmonicola*, não observado em *Opisthotrema;* a posição extracecal dos testículos é um caráter de *Opisthotrema* que *Pulmonicola* não apresenta. Quaisquer desses caracteres são, no conceito atual, suficientes para distinguir um gênero.

Opisthotrema dujonis (Leuckart, 1874) Price, 1932

Monostomum dujonis Leuckart, 1874 p. 419.
Opisthotrema cochleare Fischer, 1883 pp. 1-42, fig., *in ref.*
Opisthotrema cochleariforme Trav. & Vogelsang, 1931 p. 144 (erro).
Opisthotrema dujonis (Leuckart, 1874) Price, 1932 pp. 51-52, pl. II, fig. 46

Habitat: Trompa de Eustáquio e esôfago.
Hosp.: *Halicore dugong*.
Distr. geogr.: Ilhas Filipinas, Austrália.
Evolução: Desconhecida.

Pulmonicola Poche, 1925

Pulmonicola Poche, 1925 p. 213.
Pulmonicola Price, 1932 p. 55.

Diagnose: OPISTHOTREMATINAE; corpo ovalado com a parte dorsal convexa e a ventral côncava; estas porções são limitadas por uma orla muscular bem delimitada, interrompida apenas na porção ocupada pela ventosa oral, que é ventral e subterminal. Cutícula lisa. Faringe ausente. Cecos longos e delgados. Poro genital mediano, na extremidade posterior. Bolsa do cirro delgada, tortuosa, incluindo a vesícula seminal. Testículos de contorno liso, simétricos, situados intracecalmente na porção posterior do corpo. Ovário mediano, pretesticular, imediatamente postequatorial. Glândula de Mehlis postovariana. Espermatéca e canal de Laurer presentes. Vitelinos constituidos por folículos volumosos

situados entre as zonas ovariana e testicular, na porção intercecal. Útero intercecal, ocupando a parte mediana do corpo. Vagina dorsal e paralela à bolsa do cirro. Ovos providos de um longo filamento em cada polo. Sistema excretor (?).

Habitat: Pulmão de *Sirenia*.
Espécie tipo: *Pulmonicola pulmonale* (von Linstow, 1904) Poche, 1925.

Pulmonicola pulmonale (v. Linstw, 1904) Poche, 1925

(fig. 89)

Opisthotrema pulmonale v. Linstow, 1904 pp. 678-680, figs. 1, 2.
Pulmonicola pulmonale (v. Linstow) Poche, 1925 p. 213.
Pulmonicola pulmonale Price, 1932 p. 55, pl. 11, fig. 50.

Habitat: Pulmão.
Hosp.: *Halicore australe, H. dugong.*
Distr. geogr.: Austrália (Torres Straits).
Evolução: Desconhecida.

Cochleotrema Travassos & Vogelsang, 1931

Cochleotrema Travassos & Vogelsang, 1931 p. 143.
Opisthotrema, Price, 1932 p. 49 (em parte) *nec* Fischer, 1883.

Diagnose: OPISTHOTREMATINAE; corpo discoide; face dorsal convexa e a ventral côncava, estas faces sendo limitadas por uma orla muscular ininterrumpta e bem distinta; face ventral apresentando formações espini- ou escamiformes. Ventosa oral subventral. Faringe ausente. Esôfago curto. Cecos longos e formando alças amplas. Poro genital mediano, ventral e posterior. Bolsa do cirro longa e delgada com cirro, próstata e vesicula seminal enovelada. Testículos profundamente lobados, postequatoriais, extracecais. Ovário lobado, pretesticular, postequatorial, desviado da linha mediana. Complexo da glândula da casca posterior e lateral ao ovário. Espermatéca presente. Canal de Laurer presente na espécie tipo. Vitelinos constituidos por folículos volumosos, dorsais, intracecais, extendendo-se da zona testicular à ovariana. Útero intra e extracecal, na porção mediana do corpo. Vagina longa, musculosa, dorsal e paralela à bolsa do cirro. Ovos operculados e providos de um longo filamento em cada polo. Poro excretor dorsal, mediano, subterminal. Vesícula excretora tubular, recebendo, de cada lado, dois ramos coletores incerídos em alturas diferentes.

Habitat: Cavidade nasal de TRICHECIDAE.
Espécie tipo: *Cochleotrema cochleotrema* Travassos & Vogelsang, 1931.

Cochleotrema cochleotrema Travassos & Vogelsang, 1931

(fig. 90)

Amphistomum fabaceum Leidy, 1891 pp. 413-414 (*partim*) *nec* Diesing, 1838.
Opisthotrema cochleare Stiles *et* Hassall, 1894 p. 253, *nec* Fischer, 1883.
Cochleotrema cochleotrema Trav. & Vogelsang, 1931 pp. 144-45, figs. 1. 2.
Opisthotrema cochleotrema Price, 1932 p. 52, pl. 11, figs. 47-49.

Habitat: Cavidade nasal.
Hosp.: *Trichetus manatus, T. latirostris.*
Distr. geogr.: Estados Unidos e América tropical.
Evolução: Desconhecida.

Subfamilia CHOANOPHORINAE Caballero, 1942 emend.

METACETABULIDAE Freitas e Lent, 1938 p. 82.
CHOANOPHORINAE Caballero, 1942 pp. 81-83.

Diagnose: PRONOCEPHALIDAE: Corpo alongado com a porção posterior retractil; cuticula lisa. Colar cefálico presente ou ausente. Poro genital no terço anterior do corpo. Testiculos, em número de dois, intracecais, na metade posterior do corpo. Bolsa do cirro volumosa; vesicula seminal externa, tubular, enovelada. Bolsa cuticular copuladora presente ou ausente. Ovário localizado entre os terços médios e posterior, submediano, pretesticular. Complexo da glândula da casca imediatamente atrás do ovário. Útero preovariano, apresentando numerosas circunvoluções, principalmente na área intercecal, no terço médio do corpo. Vitelinos pouco extensos, formados por foliculos volumosos, intra e extracecais, ao nivel da zona ovariana. Ovos com ou sem filamentos polares. Aparelho excretor apresentando, em conexão com a vesícula excretora, uma parte vestibular ou "vesícula excretora secundária", bem desenvolvida, de origem ectodermica.

Habitat: Tracto intestinal de quelônios e iguanideos.
Gênero tipo: CHOANOPHORUS Caballero, 1942.

Incluimos nesta subfamilia quatro gêneros que podem ser diferenciados pela seguinte chave:

1 — Colar cefálico ausente; ovos sem filamentos polares ....
Metacetabulum Freitas & Lent, 1938.
Colar cefálico presente; ovos com filamentos polares 2

2 — "Vestíbulo" simples, testículos situados um atrás do outro .... *Cetiosaccus* Gilbert, 1938.
"Vestíbulo" bifurcado; testículos situados um ao lado do outro 3
3 — "Bolsa copuladora cuticular" presente ..... *Choanophorus* Caballero, 1942
"Bolsa copuladora cuticular" ausente ..... *Macravestibulum* Mackin, 1930

Choanophorus Caballero, 1942

Choanophorus Caballero, 1942 p. 83.

Diagnose: CHOANOPHORINAE: Corpo alongado e cilindrico; cutícula lisa; colar cefálico pouco desenvolvido; extremidade posterior do corpo truncada transversalmente e provida de duas invaginações digitiformes, que se extendem até as proximidades dos cécos (= vestíbulo). Bolsa cuticular copuladora, mediana e pre-equatorial. Ventosa oral subterminal. Faringe ausente. Esôfago dilatado na parte basal. Cecos delgados, laterais, apresentando pequenos divertículos, extendendo-se até a zona postesticular. Bolsa do cirro claviforme, mediana, pre-equatorial. Vesícula seminal externa, tubular e enovelada. Poros genitais separados e próximos, situados na linha mediana e anterior da bolsa copuladora. Útero situado na parte média do corpo, entre o ovário e a bolsa do cirro. Ovário postequatorial, à esquerda da linha mediana do corpo. Glândula de Mehlis postovariana, volumosa. Espermatéca ausente. Testículos volumosos, ovoides, postovarianos, intracecais. Vitelinos constituidos por dois grupos de folículos (15 a 17) volumosos situados nos campos laterais ao nivel da zona ovariana, extracecais e cecais. Ovos com um dos lados mais plano e providos de um longo filamento em cada polo. Sistema excretor (?).

Habitat: Tracto intestinal de quelônios.
Espécie tipo: *Choanophorus rovirosai* Caballero, 1942.
Observação: Diagnose de Caballero y C, adaptada.

Choanophorus rovirosai Caballero, 1942

(figs. 91-93)

Choanophorus rovirosai Caballero, 1942 pp. 83-85, figs. 1, 2.
Choanophorus rovirosai, Caballero, 1943 pp. 161-163, figs. 1, 2.

Habitat: Intestino.
Hosp.: *Dermatemys mawii*.
Distr. geogr.: México.
Evolução: Desconhecida.

Macravestibulum Mackin, 1930 emend.

Macravestibulum Mackin, 1930 pp. 25-29.

Diagnose: CHOANOPHORINAE. Corpo pequeno, alongado, extremidade anterior lanceolar e posterior arredondada, retractil. Cutícula lisa. Colar cefálico bem evidente, interrompido na face ventral. Ventosa oral subterminal, voltada para a face ventral. Faringe ausente. Esôfago delgado. Cecos simples, dorsais, passando para fora dos testículos e terminando atrás destes. Poro genital situado entre os terços médio e anterior, intracecal, à esquerda da linha mediana. Bolsa do cirro grande, inclinada, contendo cirro e parte prostática; vesícula seminal externa, tubular e enovelada. Testículos arredondados, situados no terço posterior do corpo, com zonas coincidindo parcial ou totalmente e campos contíguos ou superpondo-se em parte. Ovário arredondado, imediatamente pretesticular, submediano ou à direita da linha mediana. Glândula de Mehlis coincidindo com o ovário ou ligeiramente para dentro a e para trás deste. Canal de Laurer presente. Vitelinos compostos de folículos volumosos e pouco numerosos, formando dois cachos distintos acima dos testículos e principalmente nos campos intracecais. Útero extendendo-se para cima da zona ovariana, formando numerosas alças transversais, intracecais, atingindo a altura da bolsa do cirro. Vagina musculosa, tubular. Ovos apresentando um longo filamento em cada polo. Poro excretor grande, rodeado de musculos, podendo apresentar divertículos laterais, situado na porção terminal. Vesícula excretora consistindo de duas partes: a mais interna em forma de Y ou "vesícula primária", cujos ramos laterais, um em cada lado, se unem na região cefálica, e outra, mais externa ou posterior, comunicando-se com o meio exterior através o poro excretor; esta porção constitui a "vesícula secundária" ou "vestíbulo". A parte interna é ligada com a vestibular por meio de um ou vários orifícios pequenos.

A porção vestibular é bifurcada de modo a constituir duas câmaras laterais, eversiveis.

Habitat: Tracto intestinal de quelônios.

Espécie tipo: *Macravestibulum obtusicaudum* Mackin, 1930.

Macravestibulum obtusicaudum Mackin, 1930

(figs. 94-96)

Macravestibulum obtusicaudum Mackin, 1930 pp. 25-29, pl. II, figs.
Cercaria infracaudata Horsfall, 1930 pp. 42-48, pl. VII, figs. 1-7.
Macravestibulum obtusicaudum Horsfall, 1935 pp. 78-79, fig. 18.

Habitat: Intestino.

Hosp.: *Pseudemys elegans* (= *Pseudemys troosti*), *P. concinna*, *Graptemys geographica*, *G. pseudogeographica*.

Distr. geogr.: Estados Unidos, (Oklahoma).

Evolução: Por uma interessante coincidência, Mackin descreveu a forma adulta desta espécie à pg. 25 e Horsfall a forma larvária à pg. 43 da mesma publicação. Em 1935, Horsfall estabeleceu a relação entre as duas formas, mostrando que *Cercaria infracaudata* se desenvolve em *Macravestibulum obtsusicaudum*. A forma larvária foi encontrada em *Goniobasis livescens tricta*. nos Estados Unidos.

Macravestibulum eversum Hsü, 1937

Macravestibulum eversum Hsü, 1937 pp. 480-501. pl. 1, figs. 1-14, pl. 2, figs. 15-35.

Habitat: Intestino.

Hosp.: *Graptemys geographica* (exp.).

Distr. geogr.: Estados Unidos, (Michigan).

Evolução: O ciclo biológico e estudo detalhado das várias fazes, foi feito por Hsü, em 1937, nos Estados Unidos. O hospedeiro intermediário é *Goniobasis livescens*.

Metacetabulum Freitas & Lent, 1938 emend.

Metacetabulum Freitas & Lent, 1938 p. 82.

Diagnose: CHOANOPHORINAE: Corpo de tamanho médio; extremidade anterior afilada, achatada e formando uma cavidade em forma de canôa, na parte ventral, em cuja base se localiza o poro genital; daí para trás o corpo é cilíndrico; a porção posterior é retractil e com um diâmetro sensivelmente menor. Cutícula lisa. Ventosa oral terminal. Faringe ausente. Esôfago curto e delgado. Cecos dorsais, longos, passando para fora dos testículos, quasi atingindo a extremidade posterior do corpo que, quando invaginada, produz um preguamento mais ou menos pronunciado deles. Bolsa do cirro muito desenvolvida, geralmente tortuosa em forma de *C* ou *S*, contendo cirro, e parte prostática, envolta por densa camada glandular. Vesícula seminal externa, tubular, enovelada. Testículos arredondados, postequatoriais, com campos coincidindo e zonas em contacto. Vagina bem desenvolvida, sinuosa, envôlta por camada glandular densa. Ovário arredondado. dorsal. pretesticular, intracecal. Complexo da glândula de casca situado atrás

---

Macravestibulum kepneri Jones, Mounts et Wolcott. Habitat: intestino delgado de *Pseudemys troostii* e *P. texana*, Est. Unidos. *Vide* rodapé da pg. 30.

do ovário. Canal de Laurer presente. Espermatéca ausente. Vitelinos constituidos por folículos volumosos, arredondados, intra e extracecais, entre as zonas ovariana e equatorial. Útero intracecal, preovariano, formando numerosas alças transversais que atingem a parte basal da bolsa do cirro. Ovos elipsóides, operculados, apresentando uma pequena saliência mamiliforme em cada polo. Poro excretor terminal. Vesicula excretora dividida em duas partes distintas ligadas por um orificio central: uma parte mais externa, "vestíbulo" ou "vesícula secundária", correspondente à porção retractil do corpo, e uma porção interna ou "vesícula primária", que se bifurca em forma de Y, cujos ramos se dirigem para a frente e, na região cefálica, emitem várias ramificações, formando um conjunto anastomosado característico.

Habitat: Tracto intestinal de quelônios.

Espécie tipo: *Metacetabulum invaginatum* Freitas & Lent, 1938.

Metacetabulum invaginatum Freitas & Lent, 1938

(figs. 37-57)

Metacetabulum invaginatum Freitas & Lent, 1938 p. 83, pl. 4, figs. 1-3, pl. 5, figs. 1-2.

Habitat: Intestino delgado.

Hosp.: *Chelone mydas* e quelônio (sp. ?).

Distr. geogr.: Rio de Janeiro e Santos, Brasil.

Evolução: Desconhecida.

Cetiosaccus Gilbert, 1938 emend.

Cetiosaccus Gilbert, 1938 p. 100.

Diagnose: CHOANOPHORINAE: Corpo alongado; extremidade anterior com uma depressão ventral; cuticula lisa; colar cefálico pouco desenvolvido. Faringe ausente. Esôfago delgado. Cecos simples, longos, passando para fora dos testiculos e terminando atrás destes. Poro genital mediano, situado no terço anterior do corpo. Bolsa do cirro globóide; vesícula seminal externa, tubular, enovelada. Testículos arredondados ou ovalados, situados na metade posterior do corpo, com campos coincidentes e zonas afastadas. Ovário esférico, mediano, pretesticular. Glândula da casca postovariana. Espermatéca ausente. Canal de Laurer presente. Vitelinos foliculares distribuidos em dois campos laterais, intra e extracecais, preovarianos e postequatoriais. Útero muito circunvoluido, intra-

cecal, extendendo-se desde a zona ovariana até a base da bolsa do cirro. Vagina à esquerda da bolsa do cirro. Ovos com um longo filamento em cada polo. Poro excretor terminal. Vesícula excretora muito volumosa com paredes muito onduladas, ocupando a quinta parte ou mais da extremidade posterior do corpo (descrição de Gilbert); ramos coletores simples, unindo-se na região cefálica.

Habitat: Intestino de Iguanídeo.
Espécie tipo: *Cetiosaccus galapagensis* Gilbert, 1938.

Cetiosaccus galapagensis Gilbert, 1938
(figs. 97-99)

Cetiosaccus galapagensis Gilbert, 1938 pp. 98-101, pl. 12, figs. 9-11

Habitat: Intestino.
Hosp.: *Amblyrhynchus cristatus.*
Distr. geogr.: Ilhas Galapagos.
Evolução: Desconhecida.

BIBLIOGRAFIA

1. *Amaral, A. do.* Regras Internacionais de Nomenclatura Zoológica (Tradução para o português, 2.ª ed.), *Mem. Inst. Butantan,* **11**:241, 1937.
2. *Ameel, D. J.* Cercariae infecting *Pomatiopsis lapidaria, Am. Midland Naturalist,* **21**:651-656, 1939.
3. *Ameel, D. J.* The Life history of *Nudacotyle novicia* Barker, 1916 (Trematoda: Notocotylidae), *Jour. Parasitol.,* **30**(4):257-262, 1944.
4. *Barker, F. D.* Parasites of the American muskrat, *Fiber zibethicus, Jour. Parasitol.,* **1**:184-197, 1915.
5. *Barker, F. D.* A new Monostome Trematode parasitic in the muskrat with a key to the parasites of the american muskrat, *Trans. Amer. Micr. Soc.,* **35**:175-184, 1916.
6. *Baylis, H. A.* (a) — Records of some Parasitic Worms from Britisch Vertebrates, *Ann. Mag. Nat. Hist.,* S. 10, **1**:329-343, 1928.
7. *Baylis, H. A.* (b) — A new Species of *Notocotylus* (Trematoda), with some Remarks on the Genus, *Ann. Mag. Nat. Hist.,* S. 10(12), **2**:582-585, 1928.
8. *Baylis, H. A.* A Manual of Helminthology, Medical and Veterinary. Ed. Bailliere, Tindall and Cox, London, 303 pp., 1929.
9. *Baylis, H. A.* A new Species of *Notocotylus* (Trematoda), from the water-rail. *Ann Mag. Nat. Hist.,* S. 10(100), **17**:474-477, 1936.
10. *Bhalerao, G. D.* On two new monostomes (Trematoda), from avian hosts in British India, *Indian Jour. Vet. Sc. and Animal Husbandry,* **5**(1):1-15, 1935.

11. *Bhaleroo, G. D.* On two helminths oi Domestic Ruminants in India, *Porositology,* 34(2):133-137, 1942.

12. *Blanchord, E.* Recherches Sur L'Organisation des Vers, *Ann. Sc. Not., Zool.,* 3.ª Ser., 8:271-341, 1847

13. *Brandes, G.* Revision der Monostomiden, *Zentrolbl. Bokt.,* 12(15):504-511, 1892.

14. *Braun, M.* Trematoden der Dahl'schen Sammlung aus Neu-Guinea, nebst Bemerkungen ueber endoparasitische Trematoden der Cheloniden, *Zentrolbl. Bokt.,* 25(20): 714-725, 1899.

15. *Broun, M.* Trematoden der Chelonier, *Mitteilungen aus dem Zool. Mus. in Berlin.,* 2:1-58, 1909.

16. *Cobollero y C. E.* (a) — Trematodos de las tortugas de Mexico. II. Descripcion de um nuevo genero de la familia PRONOCEPHALIDAE Loos, 1902 y descripcion de una nueva especie del genero *Octongioides* Price, 1937, *An. Inst. Biol., Mexico,* 13(1):81-90, 1942.

17. *Cobollero q C. E.* (b) — Descripcion de un *Paramonostomum* (*Trcmotoda*: NOTOCOTYLIDAE) encontrado en los patos silvestres del lago Texcoco, *An. Inst. Biol., Mexico,* 13(1):91-95, 1942.

18. *Coboylero y C. E.* Trematodos de las tortugas de Mexico. III. Descripcion de un nuevo genero de la subfamilia CLADORCHINAE Fischoeder, 1901 y redescripcion de *Dermatemytrema trifoliato* Price, 1937, *An. Inst. Biol., Mexico,* 14(1):161-172, 1943.

19. *Chatterji, R. C.* The helminth parasitic in the iresh-water turtle oi Rangoon, *Records of the Indian Museum,* 38(1):81-94, 1936.

20. *Cohn, L.* Helminthohlogische Mitteilung, II, *Arch. f. Naturg.,* I(1,2):229-252, 1904.

21. *Cort, W. W.* Larval Trematodes from North American iresh-water snails. Prelim. report, *Jour. Parasitol.,* 1:65-84, 1914.

22. *Cort, W. W.* Some North American Larval Trematodes, *Illinois Biol. Monogr.,* 1:7-86, 1915.

23. *Creplin, F. C. H.* Nachträge zu Gurlt's Verzeiclmiss der Thiere, bei welchen Entozoen gefunden sind, *Arch. f. Naturg.,* 12 J, v. I:129-160, 1846.

24. *Diesing, C. M.* Systema Helminthum, Vol. I, 680 pp., Vindobonae, 1850.

25. *Duthoit, C. M. G.* A new Species of the Trematode Genus *Notocotylus, Ann. Mag. Nat. Hist.,* 7:290-293, 1931.

26. *Erickson, A. B.* Parasites of some Minnesota CRICETIDAE and ZAPODIDAE, and a Host Catalogue of helminth parasites of native American Mice, *Amer. Midl. Naturolist,* 20:575-589, 1938.

27. *Freitas, J. F. T. & Lent, T.* Sobre alguns trematodeos parasitos de *Chelone mydas* (L), principalmente *Poromphistomoidea, Mem. Inst. Oswaldo Cruz,* 33(1):79.87, 1938.

28. *Fukui, T.* Studies on Japanese Amphistomatous parasites, with revision of the group. *Jap. Jour. Zool.,* 2:219-351, 1929.

29. *Fukui, T.* *Teloporia* (Tremat.) = *Opisthopurus, Zool. Anz.,* 103:332, 1933.

30. *Fuhrmonn, O.* Zweite Klasse des Gladus Piathelminthes. Trematoda, *Hondbuch der Zoologie,* 1928.

31. *Gilbert, P. T.* Three new trematodes from the Galapagos marine iguana *Amblyrhynchus cristotus, Allan Honcock Pocific Exp.,* 2(6):91-108, 1938.

32. *Gower, W. C.* Host-Parasite Catalogue of the Helminths of Ducks, *Amer. Midl. Naturalist*, 22:580-628, 1939.

33. *Harper, W. F.* On the structure and life-histories of British fresh-water larval Trematodes, *Parasitology*, 21:189-219, 1929.

34. *Harrah, E. C.* North American Monostomes, *Illinois Biol. Monogr.*, 7(3):1-86, 1922.

35. *Harwood, P. D.* Notes on Tennessee Helminths. IV. North American Trematodes of the Subfamily NOTOCOTYLINAE, *Jour. Tenn. Acad. Sci.*, 14(3):332-340. *Ibd.*, (4):421-436, 1939.

36. *Herber, C. E.* The mother sporocysts or three species of mononostomes of the Genus *Notocotylus* (Trematoda), *Jour. Parasitol.*, 26(6):35, Supl. § 62, 1940.

37. *Herber, C. E.* Life History on two Trematodes of the Subfamily NOTOCOTYLINAE, *Jour. Parasitol.*, 28(3):179-193, 1942.

38. *Horsfall, M. W.* Studies on the structure *Cercaria infracaudata* n. sp., *Jour. Parasitol.*, 17:43-48, 1930.

39. *Horsfall, M. W.* Observations on the life history of *Macravestibulum obtusicaudum* Mackin, 1930 (Trem. PRONOCEPHALIDAE), *Proc. Helm. Soc. Wash.*, 2:78-79, 1935.

40. *Hughes, R. C., Higginbothan, J. W. & Clary, J. W.* The Trematodes of Reptiles. Part I. Systematic Section, *Amer. Midland Naturalist*, 27(1):109-134, 1942.

41. *Hsu, D. Yn-Ming.* Life History and Morphology of *Macravestibulum eversum* sp. n. (PRONOCEPHALIDAE, Trematoda), *Trans. Amer. Micr. Soc.*, 56:478-504, 1937.

42. *Ishii, N.* Studies on Bird Trematodes. I — Bird Trematodes in Japan, II — Four new Bird Trematodes, *Jap. Jour. Exp. Med.*, 11(2):91-100, 1933.

43. *Johnston, S. J.* On some Queensland trematodes, with anatomical observations and descriptions of new species and genera, *Quart. Jour. Micr.*, 59:361-400, 1913.

44. *Johnston, T. H.* New Trematodes from the Australian Water Hen, *Gallinula tenebrosa*, *Records S. Austral Mus.*, 4:135-144, 1928.

45. *Johnston, T. H.* New Trematodes from subantarctic and antarctic, *Austral Jour. Exp. Biol.*, 8:91-98, 1931.

46. *Kobayashi, H.* On some Digenetic Trematodes in Japan, *Parasitology*, 12(4):380-410, 1921.

47. *Kossack, W.* Ueber Monostomiden, *Zool. Jahrb. Abt. Syst.*, 31:491-590, 1911.

48. *Larios, I.* Dos especies de trematodos encontrados en el aparato digestivo de aves acuaticas migratorias, *An. Inst. Biol., Mexico*, 14(2):499-506, 1943.

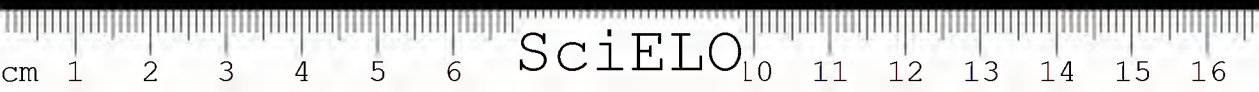
49. *Leuckart, R.* Bericht über die wissenschaftlichen Leistungen in der Naturgeschichte der niederen Thiere wärhend der Jahre 1872-75, *Arch. f. Naturg.*, J. 40, vol. 2:401-505, 1874.

50. *Linstow, von.* Neue Helminthen, *Zentralbl. f. Bakt.*, etc., 37(5):678-683, 1904.

51. *Linton, E.* Helminth fauna of the Dry Tortugas, II. Trematodes, *Publ. Carn. Inst. Wash.*, 133:11-98, 1910.

52. *Looss, A.* Weitere Beiträge zur Kenntniss der Trematoden-Fauna Aegyptens, etc., *Zool. Jahrb.*, 12:521-784, 1899.

53. *Looss, A.* Notizen zur Helminthologie Egyptens. IV. Ueber Trematoden aus Seeschildkröten der aegyptischen Küsten, *Zentralbl. f. Bakt.*, etc., 30:555-569, 618-625, 1901.

54. *Looss, A.* Ueber neue und bekannte Trematoden aus Seeschildkröten. Nebst. Erörterungen zur Systematik und Nomenclatur, *Zool. Jahrb. Syst.*, 16:411-894, 1902.

55. *Luehe, M.* Parasitisch Platwürmer. I. Trematodes. *Die Süsswasserfauna Deutschlandes,* Jena, **17**:1-217, 1909.

56. *Luhman, M.* Two new Trematodes from the Loggerhead Turtle (*Caretta caretta*). *Jour. Parasitol.*, **21**(4):274, 1935.

57. *Luttermoser, G. W.* A note on the life history of the Monostome *Notocotylus urbanensis, Jour. Parasitol.*, **21**(6):456, 1935.

58. *Mac Callum, G. A.* Studies in Helminthology, *Zoopathologica*, **1**(6):140-284, 1921.

59. *Mackin, J. G.* A new Pronocephalid monostome from a fresh water turtle (*Caretta caretta*), *Jour. Parasitol.*, **17**:25-29, 1930.

60. *Mathias, P.* Sur le cycle évolutif d'un Trématode de la famille NOTOCOTYLIDAE Luhe (*Notocotylus attenuatus* Rud.), *Compt. Rend. Acad. Sc.*, 7 jul.:75-78, 1930.

61. *Mc Intosh, A. & Mc Intosh, G. E.* A new trematode, *Notocotyle hassali n. sp.* (NOTOCOTYLIDAE) from a meadow mouse. *Proc. Helm. Soc. Wash.*, **1**(2):37, 1934

62. *Mehra, H. R.* Noveaux monostomes de la famille PRONOCEPHALIDAE des tortues d'eau douce d'Inde. Classification de cette famille. *Ann. Parasitol.*, **10**:225-247, 1932 a.

63. *Mehra, H. R.* Classification de la famille des PRONOCEPHALIDAE Looss, *Ann. Parasitol.*, **10**:323-329, 1932 b.

64. *Mehra, R. K.* New monostomes of the family PRONOCEPHALIDAE Looss, 1902, *Proc Nat. Acad. Sc. India*, **9**:99-130, 1939.

65. *Moghe, M. A.* Two New Species of Trematodes from an Indian Ruff (*Philomachus pugnax* Gray), *Parasitology*, **24**(1):56-59, 1932.

66. *Monnig, H. O.* Veterinary Helminthology and Entomology. Bailliere, Tindall Cox, ed., London, 402 pp. 1934.

67. *Morishita, K.* Some Avian Trematodes from Japan, especially from Formosa, with Reference List of All Known Japanese Species, *Annot. Zool. Japanenses*, **12**(1): 134-169, 1929.

68. *Muehling, P.* Die Helminthen-Fauna der Wirbeltiere Ostpreussens, *Arch. f. Naturg.*, **64**, B. 1:1-118, 1898.

69. *Neveu-Lemaire, M.* Traité d'Helminthologie Medical et Véterinaire, Paris, 1514 pp., 1936.

70. *Nicoll, W.* A Reference-List of the Trematode parasites of British Amphibia, *Parasitology*, **18**:14-20, 1926.

71. *Noble, A. E.* Two New Trematodes from the American Coot, *Trans. Amer. Micr. Soc.*, **52**:353, 1933.

72. *Oguro, G.* Einige neue und bekannte Pronocephaliden aus Japanischen Seeschildkröten, *Jour. Sc. Hiroshima Univ.*, Ser. B. Div. I, **5** Art. I:1-28, 1936.

73. *Poche, F.* Das System der Platodaria, *Arch. f. Naturg.*, **91**(2/3):1-458, 1925.

74. *Pratt, H. S.* Synopses of North American Invertebrates. XII. Trematodes, *Amer. Naturalist*, **36**:953-971, 1902.

75. *Pratt, H. S.* Trematodes of the loggerhead turtle (*Caretta caretta*) of the Gulf of Mexico, *Arch. Parasitol.*, **16**:411-427, 1914.

76. *Price, E. W.* Four new species of trematode worms from the muskrat, *Ondrata zibethica*, with a key to the trematode parasites of the muskrat, *Proc. U. S. Nat. Mus.*, **79**, Art. 4:1-13, 1931 a.

77. *Price, E. W.* Redescription of two species of trematode worms from the Mac Callum collection with a note on the family PRONOCEPHALIDAE, *Proc. U. S. Nat. Mus.*, **78**(22):1-10, 1931 b.

78. *Price, E. W.* The Trematode parasites of Marine Mammals, *Proc. U. S. Nat. Mus.*, **81**(13):1-68, 1932.

79. *Rothschild, M.* Notes on the Classification of Cercariae of the Superfamily *Notocotyliodea* (*Trematoda*), with special reference to the Excretory system, *Novit. Zool.*, 41(2):75-83, 1938.

80. *Rudolphi, C. A.* Entozoorum sive vermium intestinalium historia naturalis, v. 2 Amstelaedami, 457 pp., 1809.

81. *Rudolphi, C. A.* Entozoorum Synopsis cui accendunt mantissa duplex et ingices locupletissimi, Berolini, 811 pp., 1819 .

82. *Ruiz, J. M.* Considerações sobre a classificação das famílias PRONOCEPHALIDAE Looss, 1902 e NOTOCOTYLIDAE Luehe, 1909. *Rev. Bras. Biol.*, **4**(2):215-228, 1944.

83. *Skrjobin, K. I. & Schulz, R.* Ein neue Trematode, *Ogmocotyle pygargi* n. gen., n. sp., aus einen Reh (*Capreolus pygargus bedfordi* Thomas), *Zool. Anz.*, **102**: 267-270, 1933.

84. *Stephens, J. W. W.* *Desmogonius desmogonius*, a new species and genus of monostome flukes, *Ann. Trop. Med. Parasit.*, **31**:215-244, 1911.

85. *Stunkard, H. W.* Morphology and relationships of the trematode *Opisthoporus aspidonectes* (Mac Callum, 1917) Fukui, 1929, *Trans. Amer. Micr. Soc.*, **49**:210-219, 1930.

86. *Stunkard, H. W.* On the Trematode Genus *Teloporia*, *Zool. Anz.*, **106**:218-220, 1934.

87. *Stunkard, H. W.* and *Dunihue, F. W.* Notes on Trematodes from Long Island Duck with description of a new species, *Biol. Bull.*, **60**(2):179-186, 1931.

88. *Szidat, U.* Weitere Beiträge zur Kenntnis des Trematoden der Monostomidengattung *Notocotylus* Diesing, *Zentralbl. Bakt.*, etc., **133**:265-270, 1935.

89. *Szidat, U.* Beiträge zur Kenntnis der Trematodengattung *Notocotylus* Diesing. III. *Notocotylus linearis* (Rud. 1919 ?) n. sp. aus den Blinddärm der Kieb... (*Vanellus vanellus*), *Zentralbl. Bakt.*, etc., **136**:231-235, 1936.

90. *Szidat, U. & Lothar, von.* Beiträge zur Kenntnis des Trematoden der Monostomidengattung *Notocotylus Diesing*, *Zentralblat Bakt.*, etc., **129**:411-422, 1933.

91. *Travassos, L.* Trematodeos novos. II., *Brasil Médico*, **1**(15):179-180, 1921.

92. *Travassos, L.* Informações sobre a fauna helminthologica de Matto Grosso, *Folha Médica*, **3**(24):187, 1922.

93. *Travassos, L.* Contribuição ao conhecimento de alguns trematoides de Mato Grosso, NUDACOTYLIDAE Barker, 1916, *Bol. Biol.*, **4**(2):160-167, 1939.

94. *Travassos, L. & Vogelsang, E.* Pesquisas helminthologicas realisadas em Hamburgo. II. Sobre dois trematodeos parasitos de mamiferos, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **23**:169-171, 1930.

95. *Travassos, L. & Vogelsang, E.* Novo tipo de trematodio OPISTHOTREMATIDAE, *Boletim Biológico*, Rio de Janeiro, **19**:143-147, 1931.

96. *Tubangui, M.* Trematode Parasites of Philippine Vertebrates. V. Flukes from birds. *Phil. Jour. Sci.*, **47**:369-404, 1932.

97. *Viana, L.* Tentativa de Catalogação das espécies brasileiras de Trematodeos, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **17**(1):95-227, 1924.

98. *Villot, M. A.* Organisation et Development de quelques espèces de Trématodes Endoparasites Marins, *Ann Sc. Nat.*, **8** ser. 6 (art. 2):1-40, 1879.

99. *Word, E. B. & Whipple, G. Ch.* Fresh-Water Biology. John Wiley & Sons, Inc., New York, 1.111 pp., 1918.

100. *Yamaguti, S.* Studies on the Helminth-Fauna of Japan. Part I. Trematodes of Birds, Reptiles and Mammals, *Jap. Jour. Zool.*, **5**(1):1-134, 1933.

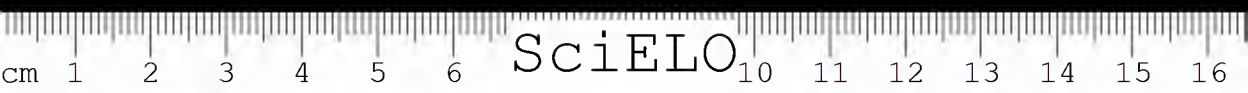
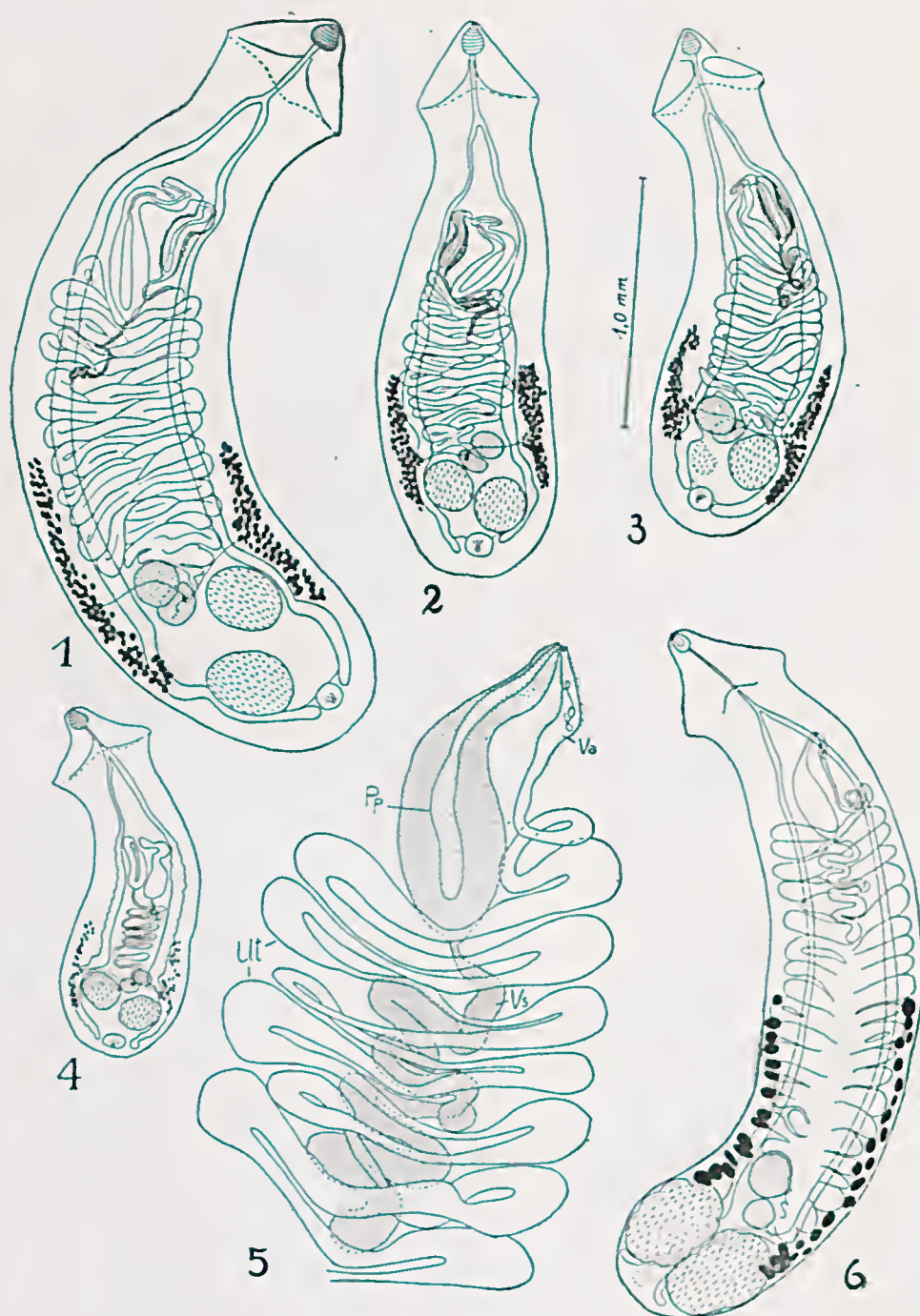
101. *Yamaguti, S.* Studies on the Helminth-Fauna of Japan. Part 3. Avian Trematodes. II, *Jap. Jour. Zool.*, **5**(4):543-883, 1934.

102. *Yamaguti, S.* Zur Entwickelungsgeschichte von *Notocotylus attenuatus* (Rud. 1809) und *N. magniovatus* Yamaguti, 1934, Z. *Parasitenk.*, **10**:288-292, 1938.

103. *Yamaguti, S.* Studies on the Helminth-Fauna of Japan. Part 25. Trematodes of Birds, VI, *Jap. Jour. Zool.*, **8**(2):131-210, 1939.

104. *Yamaguti, S.* Studies on the Helminth-Fauna of Japan. Part 32. Trematodes of Birds, V, *Jap. Jour. Zool.*, **9**(3):321-341, 1941.

ABREVIAÇÕES USADAS NAS FIGURAS

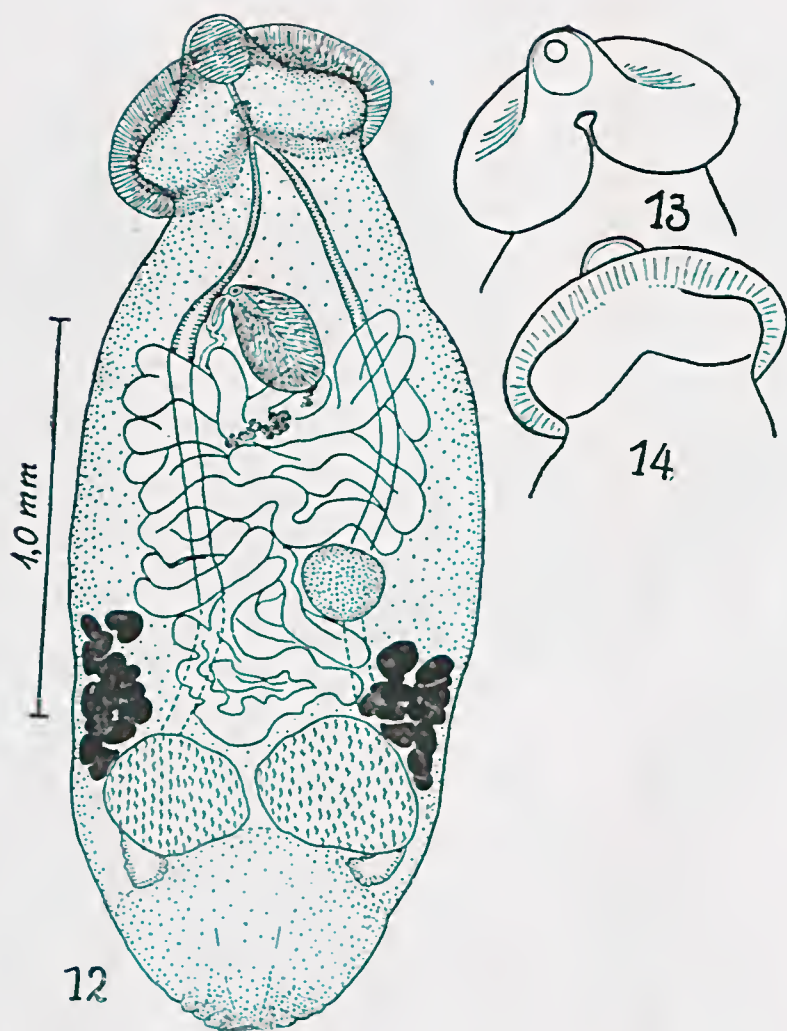
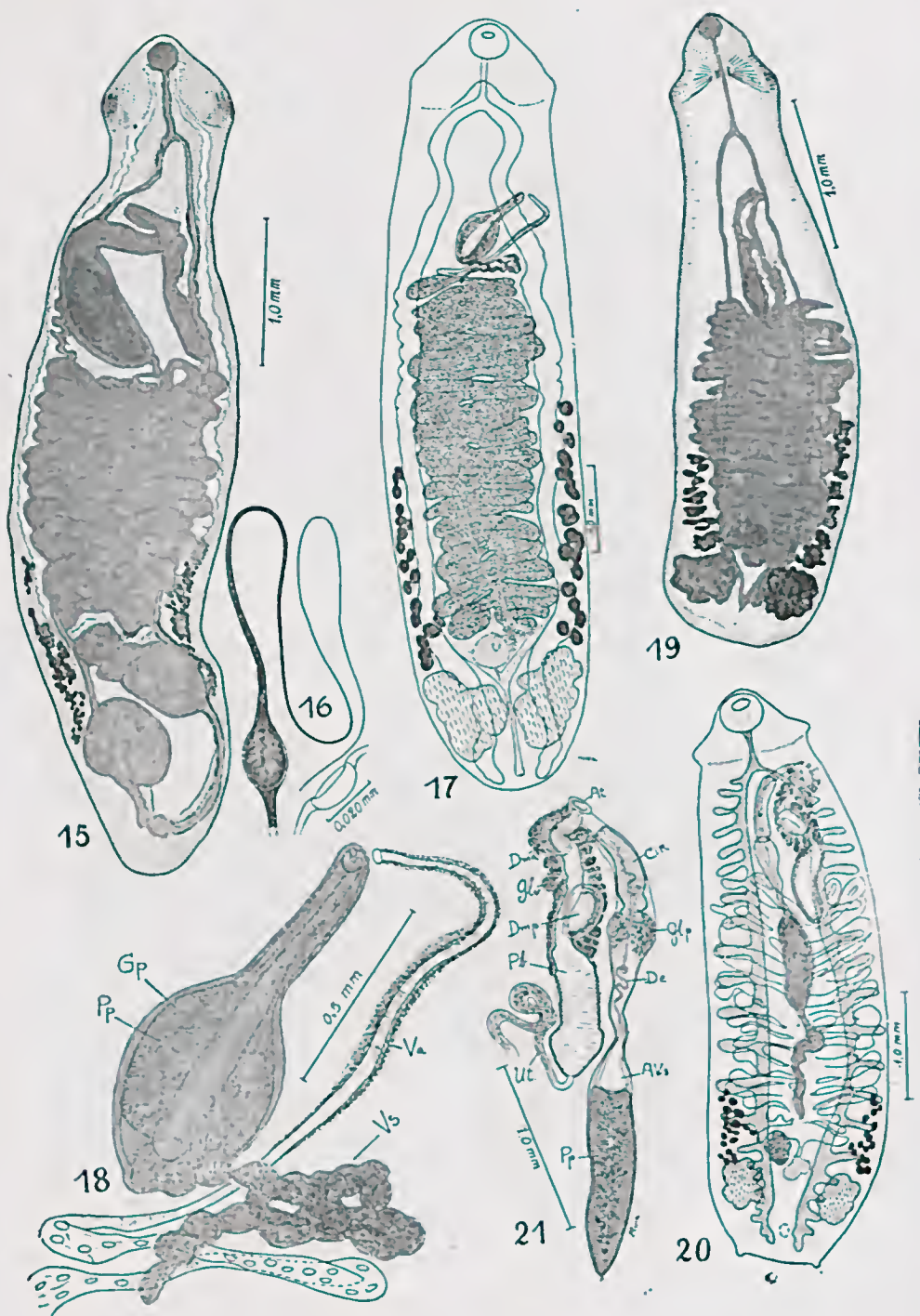
At = átrio genital, *Avs.* = antecâmara da vesícula seminal, *Bc* = bolsa do cirro, *Cex* = canal excretor, *Cir* = cirro, *CL* = canal de Laurer, *De* = ducto ejaculador, *Dma* = dilatação musculosa anterior (da vagina), *Dmp* = dilatação musculosa posterior (da vagina), *Glp* = glândulas penianas, *Glv* = glândulas peri vaginais, *GM* = glândula de Mehlis, *Gp* = glândulas prostáticas, *Ov* = ovário, *Pex* = poro excretor, *Pp* = parte prostática, *Pgc* = poro genital, *Pb* = parte basal (da vagina), *T* = testículo, *Va* = vagina, *Vest* = vestíbulo, *Vex* = vesícula excretora, *Vit* = vitelinos, *Vs* = vesícula seminal.

FIGS. 1 a 4 — *Pronocephalus trigonocephalus* Looss, 1899. Lam. 7.400 do Inst. O. Cruz. [illegible]enhos na mesma escala. Original.

FIGS. 5, 6 — *Pleurogonius lobatus* (Looss, 1901). Vista total e pormenor da bolsa do [illegible] e metratermo. Lam. 9.888 do Inst. O. Cruz. Original.

FIGS. 7, 8 — *Pronocephalus trigonocephalus* Looss, 1899. Vista total e pormenor da extremidade anterior. Segundo Mehra (1939).

FIG. 9 — *Pronocephalus trigonocephalus* Looss, 1899, segundo Loosss (1899).

FIG. 10 — *Pronocephalus trigonocephalus* Looss, 1899, segundo Looss (1902).

FIG. 11 — *Pronocephalus trigonocephalus* Looss, 1899, segundo Oguro (1936).

FIGS. 12, 13, 14 — *Pronocephalus minutus* sp. n. Vista total (12); detalhe do colar cefálico, vista ventral (13) e dorsal (14). Original.

FIGS. 15, 16 — *Pronocephalus trigonocephalus* Looss, 1899. Total e ovo. Col. Inst. Butantan. Original.
FIGS. 17, 18 — *Pyelosomum crassum* (Looss, 1901). Vista total (17), pormenor da bolsa do cirro e metratermo (18). Lam. 9.772, col. Inst. O. Cruz. Original.
FIG. 19 — *Pleurogonius linearis* Looss, 1901. Vista total. Col. do Inst. Butantan. Original.
FIGS. 20, 21 — *Cricocephalus albus* (Kuhl et von Hasselt, 1822). Vista total (20), pormenor da bolsa do cirro e metratermo (21).

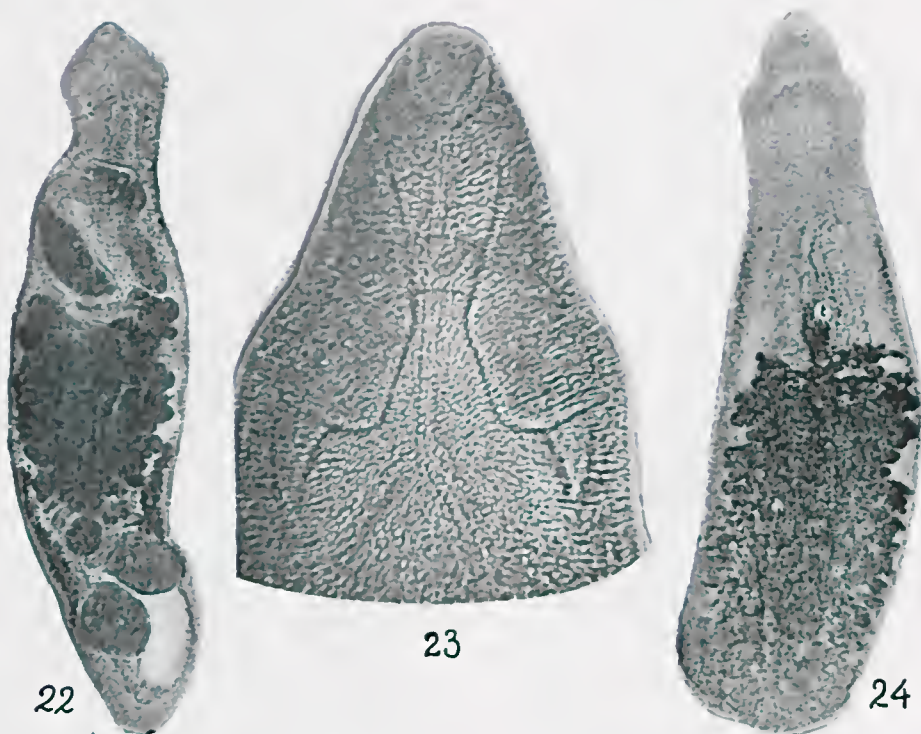



Fig. 22 — *Pronocephalus trigonocephalus* Looss, 1899. Microfotografia do exemplar da figura 15.
Fig. 23 — *Pleurogonius linearis* Looss, 1901. Microfotografia da extremidade anterior, face ventral.
Fig. 24 — *Pleurogonius linearis* Looss, 1901. Microfotografia do exemplar da figura 19.

FIG. 25 — *Cricocephalus albus* (Kuhl et von Hasselt, 1822). Total, segundo Looss (1899).
FIG. 26 — *Pyelosomum cochlear* Looss, 1899. Total, segundo Looss (1899).

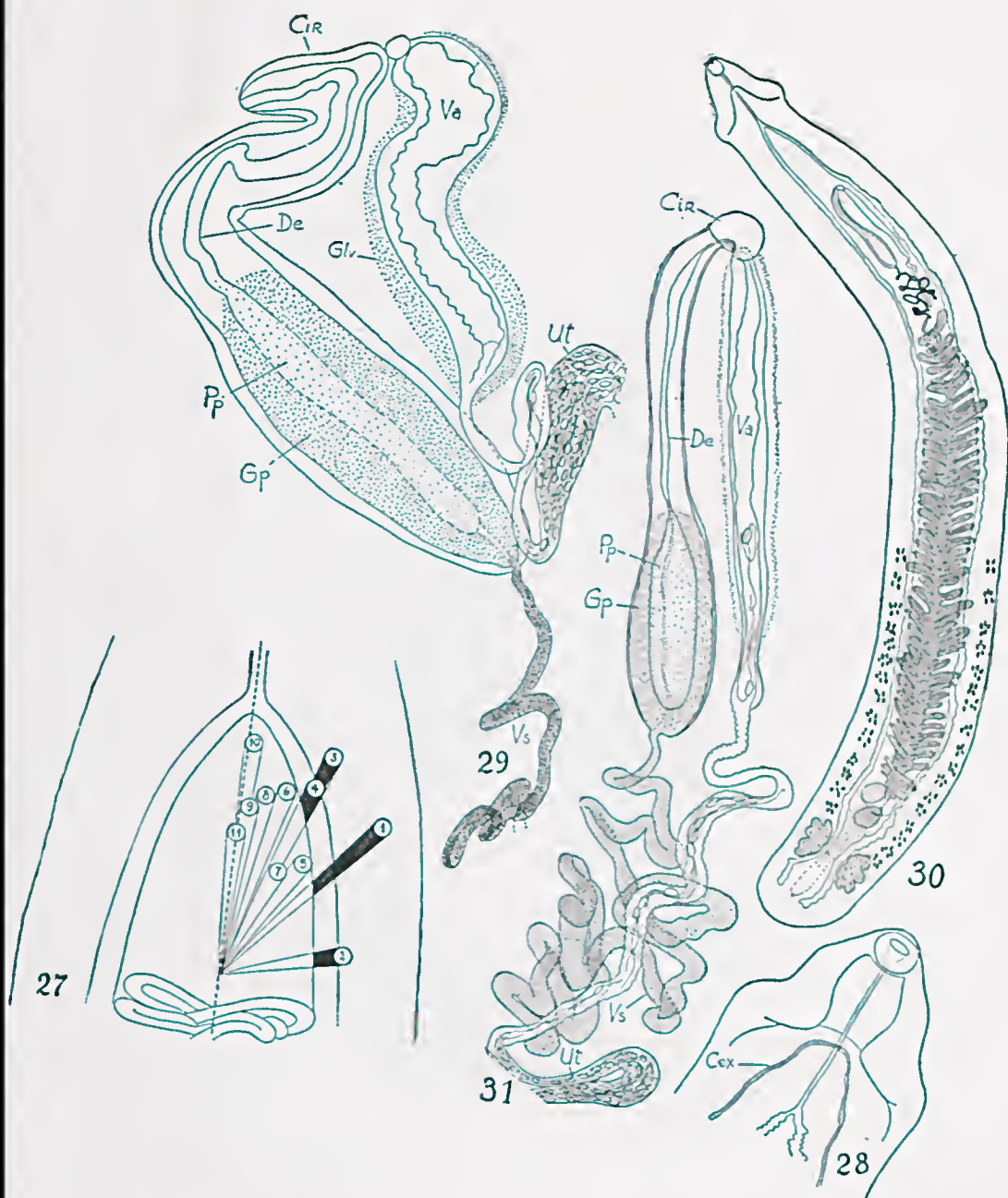



FIG. 27 — Esquema demonstrando a variação da posição do poro genital no gênero *Pleurogonius*. (1) = *P. candidulum*, (2) = *P. pomacanthi*, (3) = *P. Merkai*, (4) = *P. lobatus*, (5) = *P. trigonocephalus*, (6) = *P. linearis*, *P. karachii*, *P. solidus*, (7) = *P. sindhii*, *P. minutissimus*, (8) = *P. ozakii*, *P. longiusculus*, (9) = *P. bilobus*, (10) = *P. macrophallus*, *P. cheloniae*, (11) = *P. keamarii*.

FIG. 28 — *Pleurogonius linearis* Looss, 1901. Detalhe da porção anterior, vista ventral. Original.

FIG. 29 — *Pronocephalus trigonocephalus* Looss, 1899. Pormenor da bolsa do cirro e metratermo. Lam. 7.400, col. Inst. O. Cruz. Original.

FIGS. 30, 31 — *Pleurogonius longiusculus* Looss, 1901. Vista total (30), pormenor da bolsa do cirro e metratermo (31). Lam. 9.770, col. Inst. O. Cruz. Original.

FIGS. 32, 33, 34 — *Pleurogonius longiusculus* Looss, 1901, segundo Looss (1902).

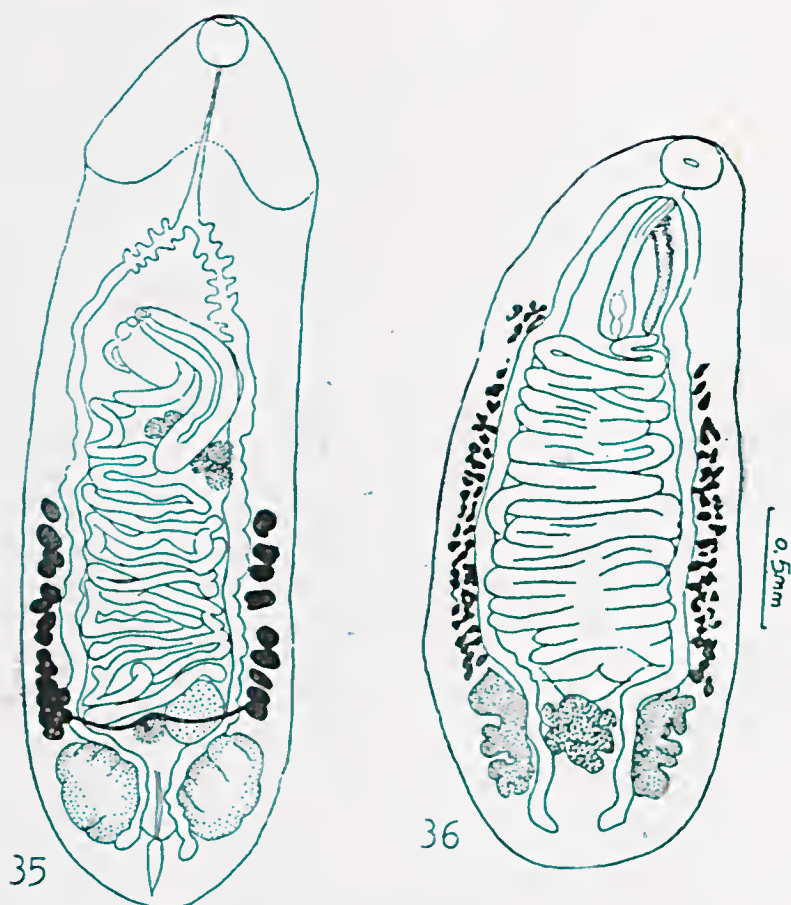
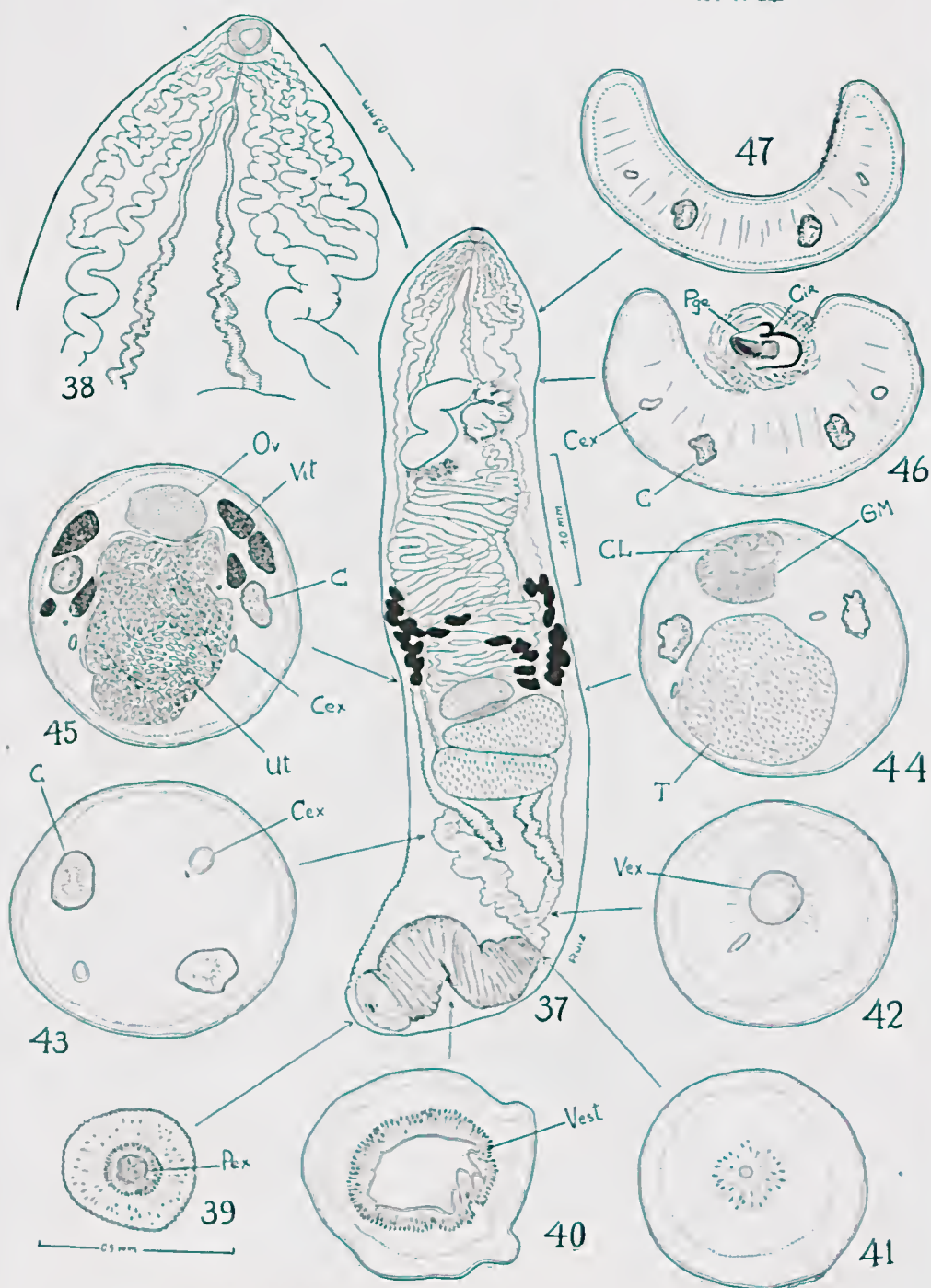
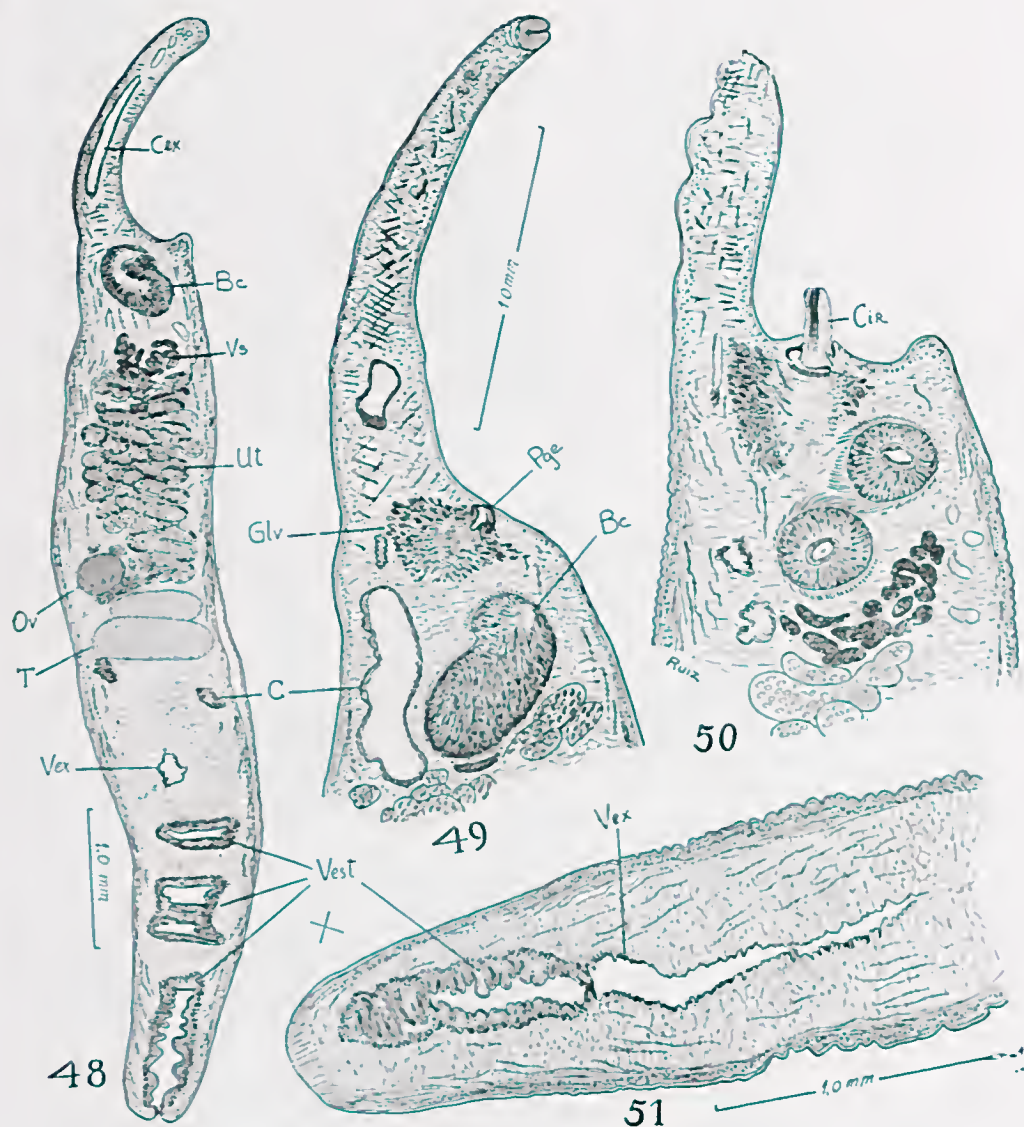



FIG. 35 — *Pleurogonius trigonocephalus* (Rudolphi, 1809). Vista total. Cópia do desenho de Braun (1901).

FIG. 36 — *Paramonostomum ionorne* Travassos 1921, segundo Travassos (1921).

FIGS. 37, 38 — *Metacetabulum invaginatum* Freitas e Lent, 1938. Vista total (37) e pormenor da extremidade anterior mostrando os canais excretores (38). Original.

FIGS. 39 a 47 — *Metacetabulum invaginatum* Freitas e Lent, 1938. Série de cortes transversais de várias regiões (indicadas pelas flexas). Desenho esquemático feito em câmara clara, na mesma escala. A seriação dos cortes segue a ordem numérica. Original.

FIGS. 48, 49 — *Metacetabulum invaginatum* Freitas e Lent, 1938. ortes longitudinais do mesmo exemplar. Original.

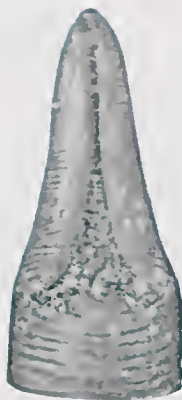
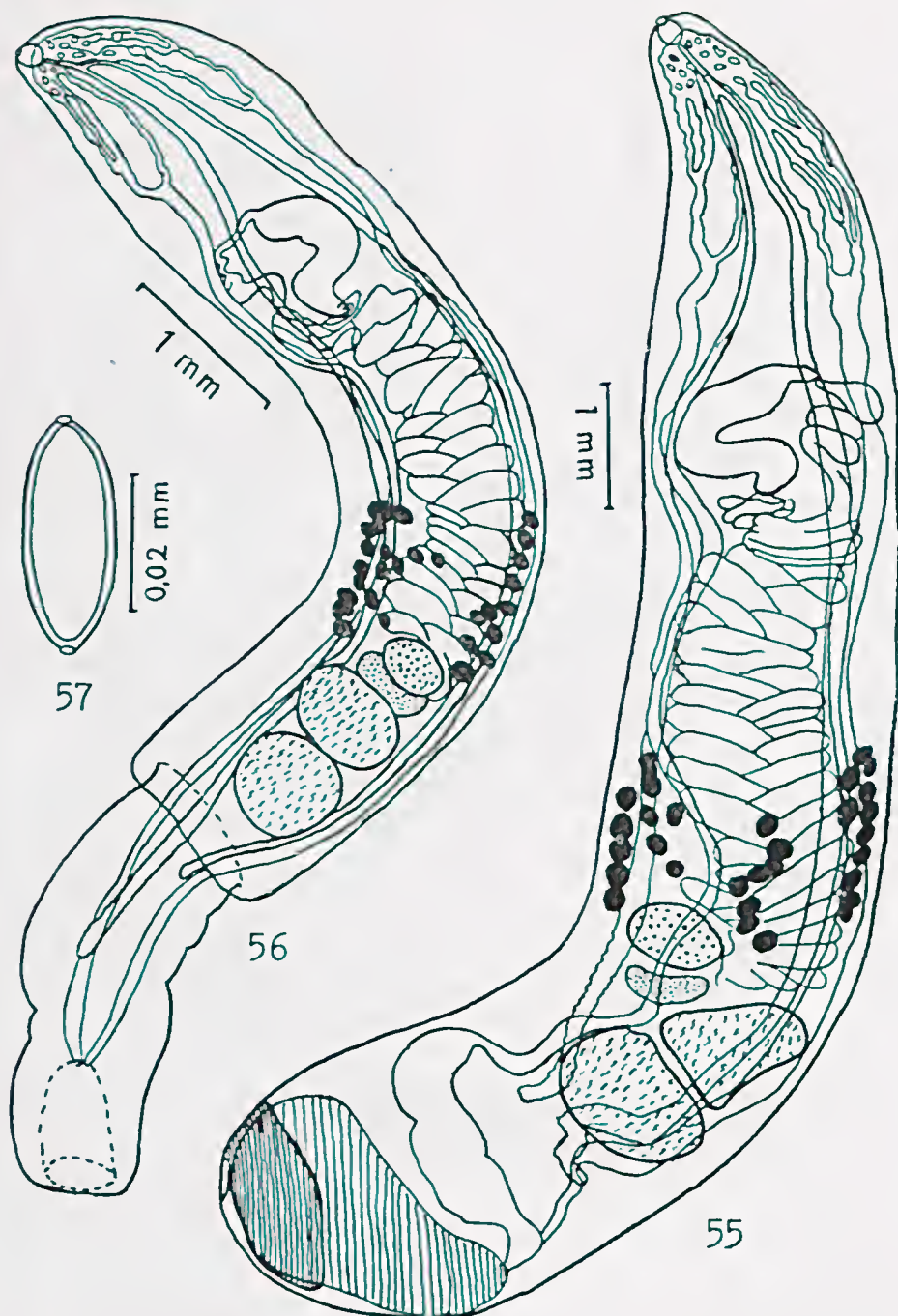
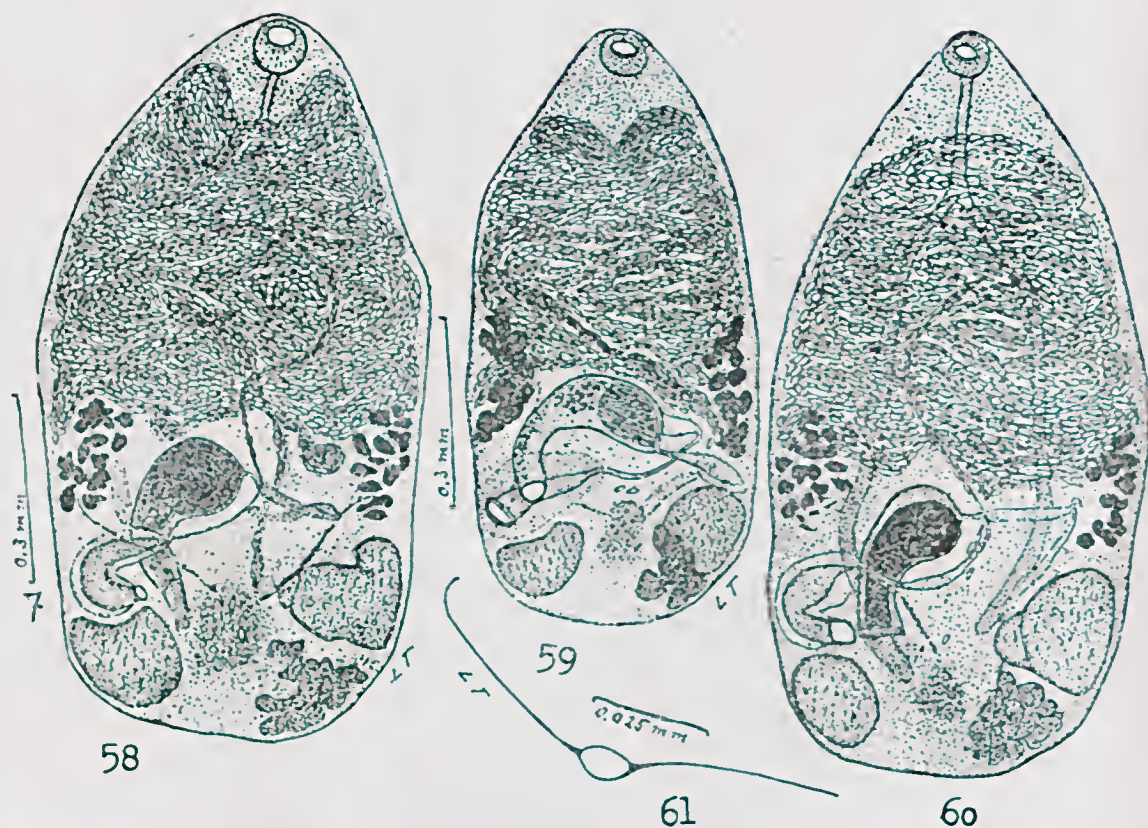
FIGS. 50, 51 — *Metacetabulum invaginatum* Freitas e Lent, 1938. Cortes longitudinais do mesmo exemplar; vista anterior (50) e posterior (51). Câmara clara. Original.

FIGS. 52, 53, 54 — *Metacetabulum invaginatum* Freitas e Lent, 1938. Desenhos da extremidade anterior, vista ventral, de exemplares não comprimidos (52-53): detalhe do ovário e complexo da glândula da casca, baseado em cortes histológicos (54). Originais.

FIGS. 55, 56, 57 — *Metacetabulum invaginatum* Freitas e Lent, 1938, segundo Freitas e Lent (1938). Vistas totais (55-56) e ovo (57).

FIGS. 58 a 61 — *Nudacotyle tertius* Travassos, 1939, segundo Travassos (1939). Reprodução do original.

FIG. 62 — *Nudacotyle novicia* Barker, 1916, segundo Barker (1916).
FIGS. 63, 64 — *Nudacotyle valdevaginatus* Travassos, 1922, segundo Travassos (1939). Reprodução do original.
FIG. 65 — *Neocotyle neocotyle* Travassos, 1922, segundo Travassos (1939). Reprodução do original.

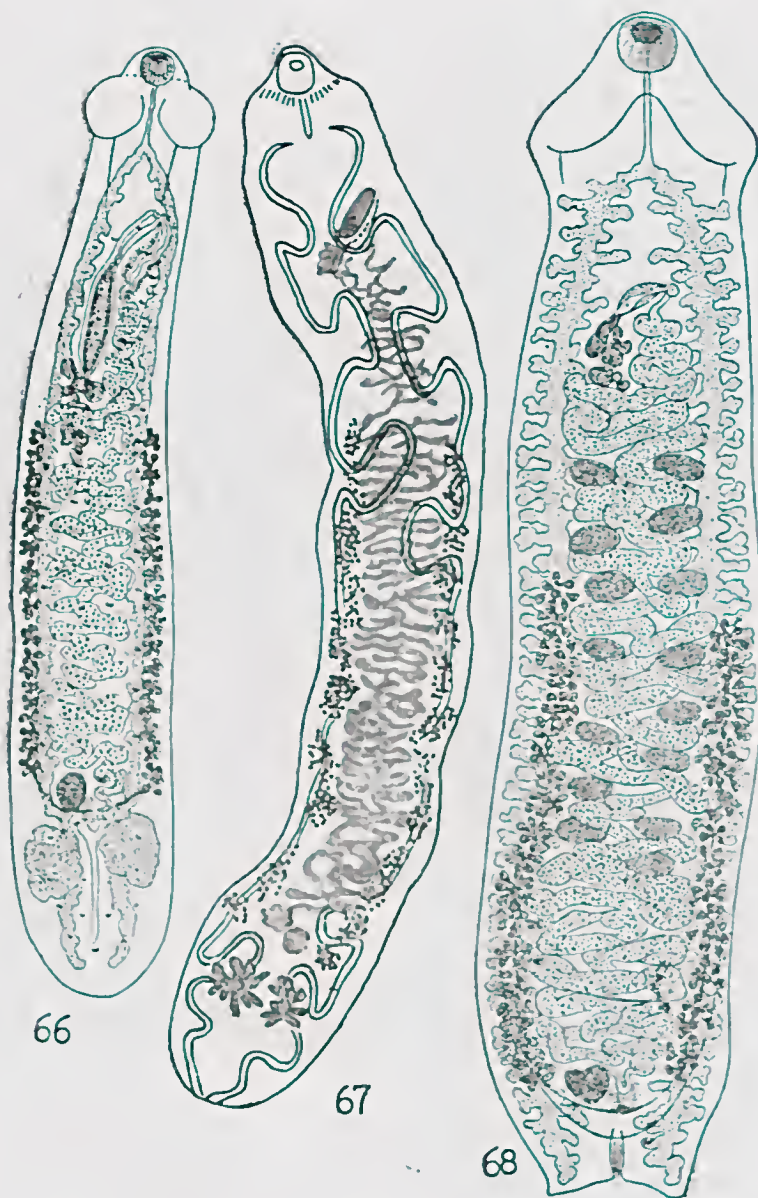



FIG. 66 — *Adenogaster serialis* Looss, 1901, segundo Looss (1902).
FIG. 67 — *Pyelosomum renicapite* (Leidy, 1856), segundo Braun (1901).
FIG. 68 — *Charaxicephalus robustus* Looss, 1901, segundo Looss (1902).

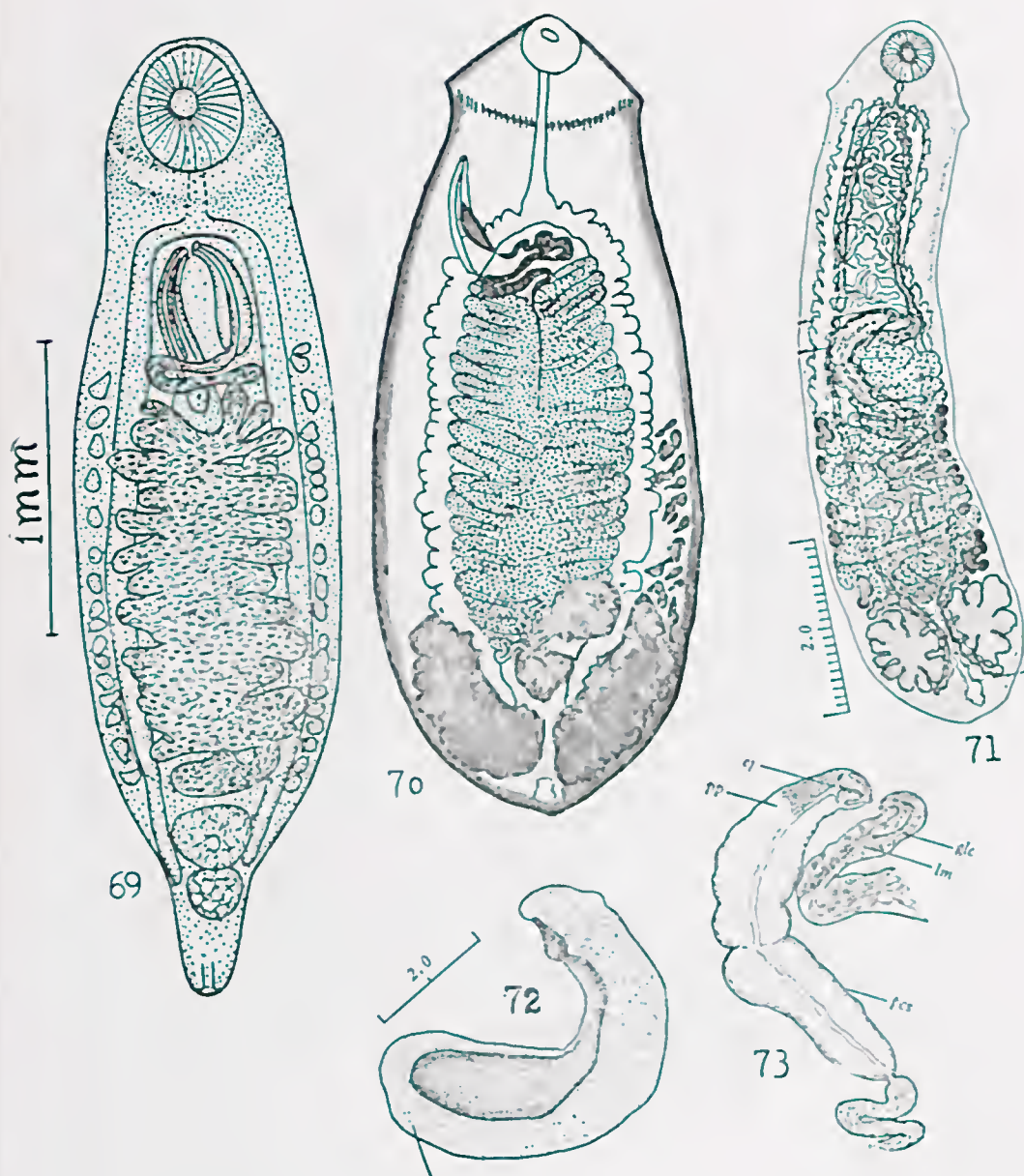



FIG. 69 — *Teloporia aspidonectes* (MacCallum, 1917), segundo Price (1931).
FIG. 70 — *Renigonius orientalis* Mehra, 1939, segundo Mehra (1939).
FIGS. 71, 72, 73 — *Iguanacola navicularis* Gilbert, 1938. Vista total (71), aspecto externo (72) e pormenor da bolsa do cirro e metratermo (73). Reprodução do original de Gilbert (1938).

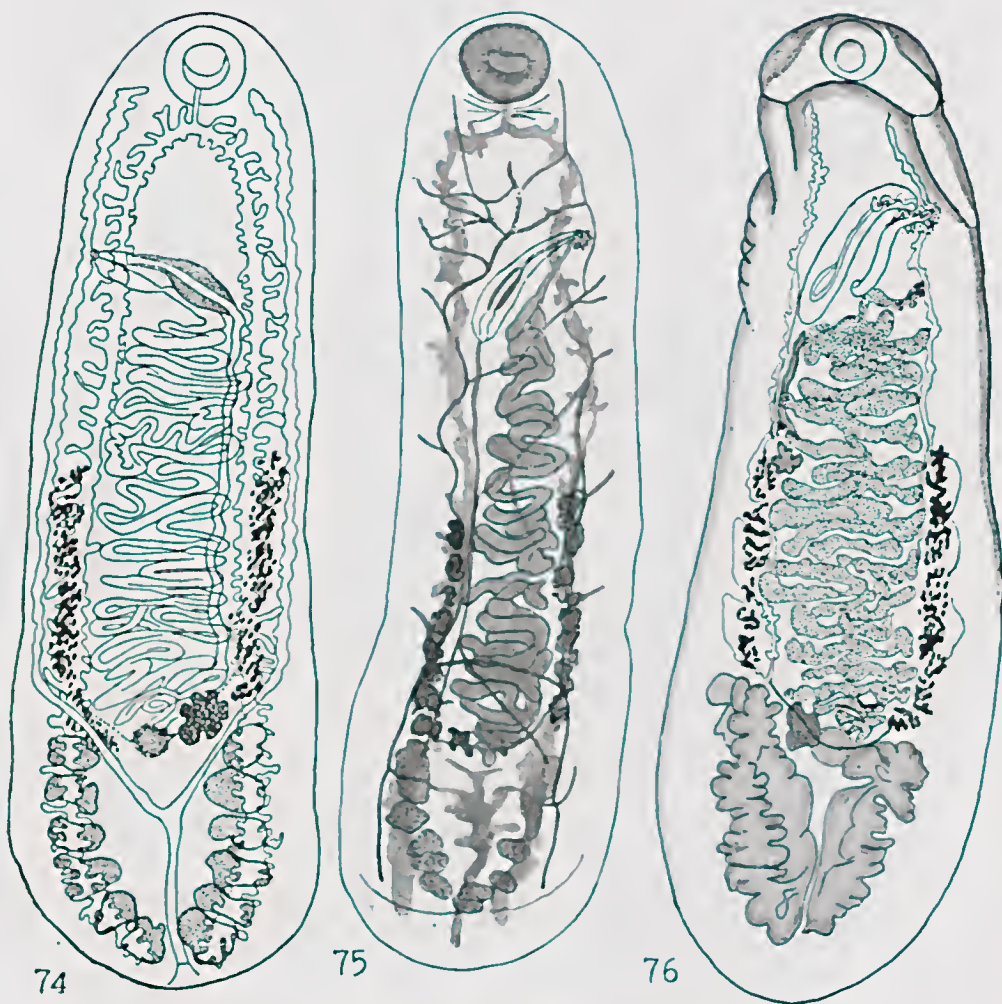



FIG. 74 — *Diaschistorchis pandus* (Braun, 1901), segundo Pratt (1914). (= Wilderia eliptica).
FIG. 75 — *Diaschistorchis pandus* (Braun, 1901), segundo Johnston (1913).
FIG. 76 — *Diaschistorchis pandus* (Braun, 1901), segundo Braun (1901).

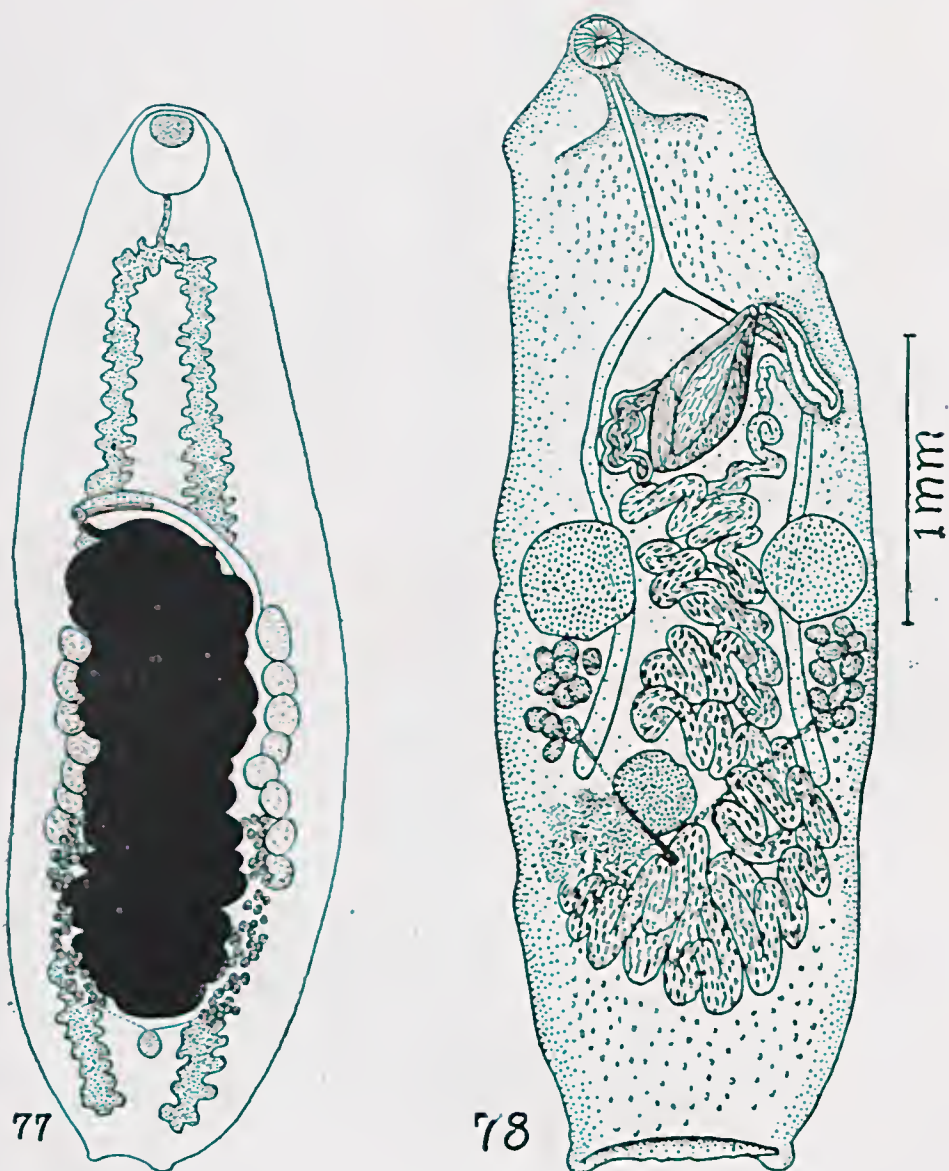



FIG. 77 — *Desmogonius desmogonius* Stephens, 1911, segundo Stephens (1911).
FIG. 78 — *Neopronocephalus triangularis* Mehra, 1932, segundo Mehra (1932).

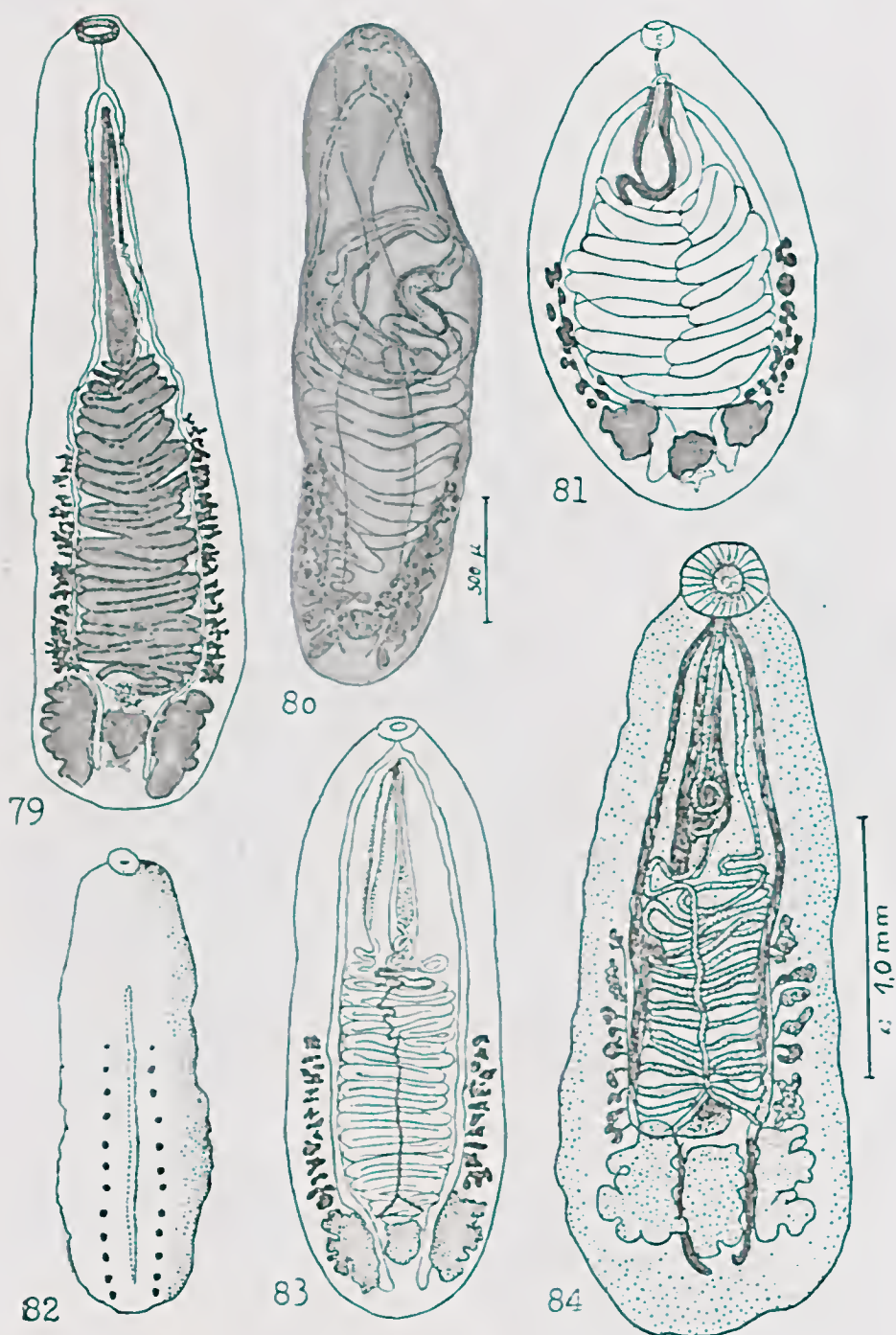
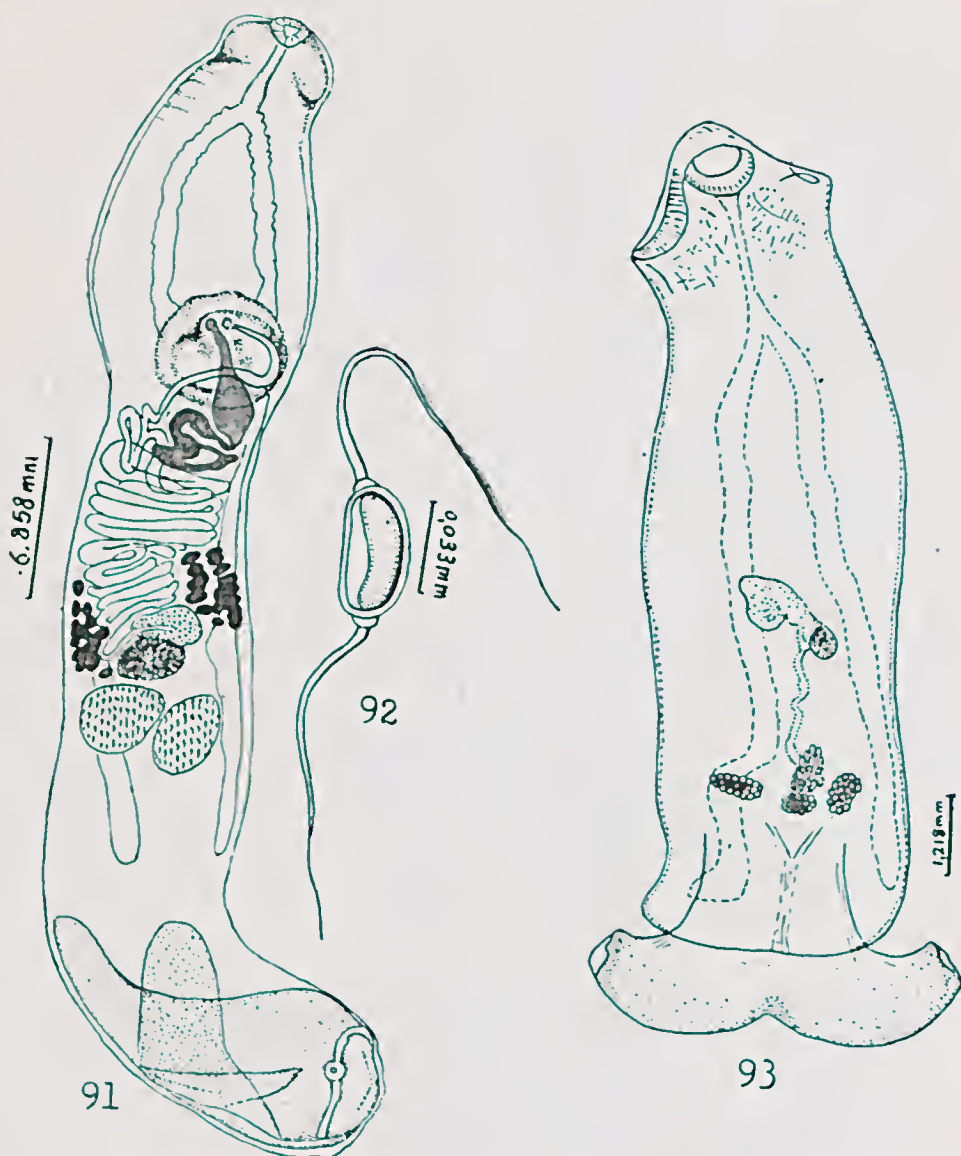



FIG. 79 — *Notocotylus attenuatus* (Rud. 1809), segundo L. e U. Szidat (1933).
FIG. 80 — *Ogmocotyle pygargi* Skrj. et Schulz, 1933, segundo Skrj. e Schulz (1933).
FIG. 81 — *Paramonostomum alveatum* (Mehlis, *in* Creplin), segundo Muehling (1893).
FIGS. 82, 83 — *Catatropis verrucosa* (Froelich, 1789), segundo Odhner, *in* Baylis (1929).
FIG. 84 — *Quinqueserialis quinqueserialis* (Barker et Laughlin, 1911), segundo Barker (1915).

Fig. 85 — *Hofmonostomum himantopodis* Harwood, 1939, segundo Harwood (1939).

FIGS. 91, 92 — *Choanophorus rochrosai* Caballero, 1942. Vista total do exemplar tipo (91) e ovo (92). Segundo Caballero (1942).
FIG. 93 — *Choanophorus rochrosai* Caballero, 1942. Exemplar jovem. Segundo Caballero (1943).

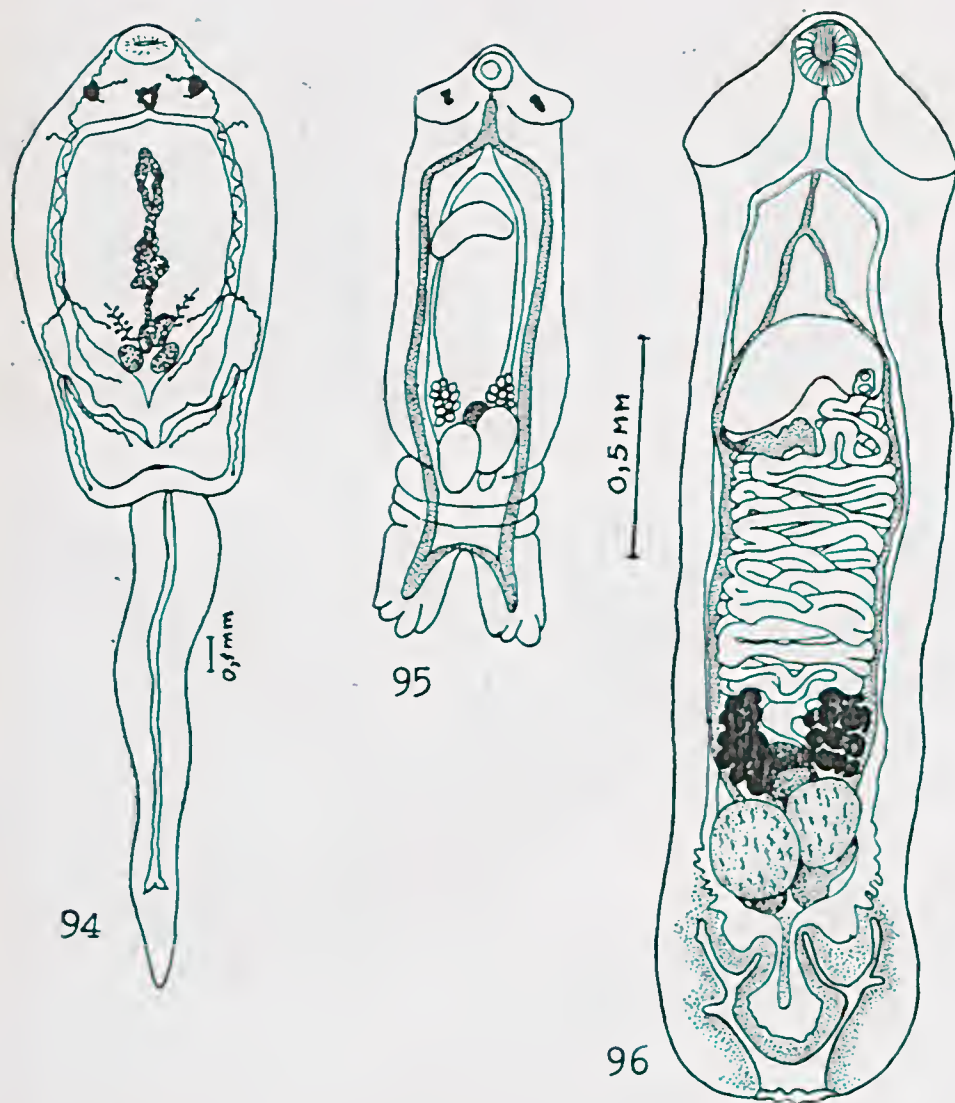
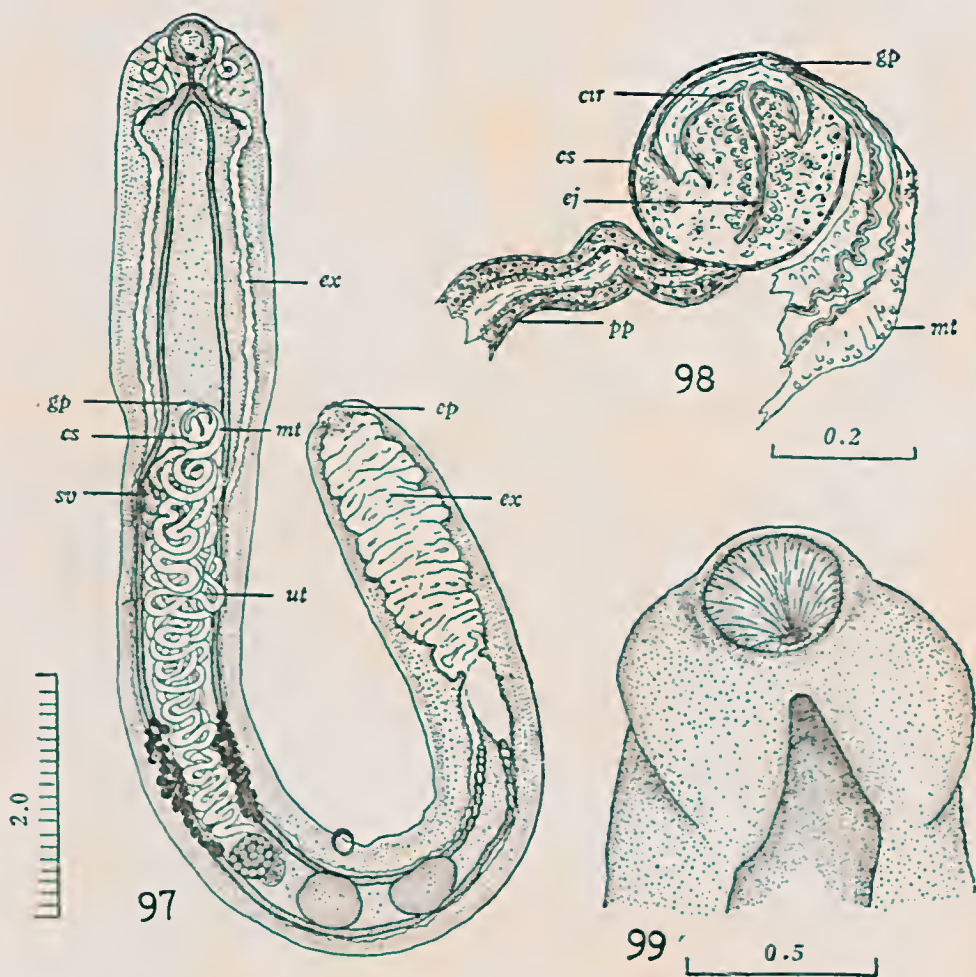



FIG. 94 — *Macravestibulum obtusicaudum* Mackin, 1930. Cercária desenvolvida. Segundo Horsfall (1930).
FIG. 95 — *Macravestibulum obtusicaudum* Mackin, 1930. Exemplar jovem. Segundo Horsfall (1935).
FIG. 96 — *Macravestibulum obtusicaudum* Mackin, 1930, segundo Mackin (1930).

FIGS. 97, 98, 99 — *Cetiosaccus galapagensis* Gilbert, 1938. Vista total (97), pormenor da bolsa do cirro (98) e vista ventral da extremidade anterior (99). Segundo Gilbert (1938). Reprodução do original.